# Auftrennung und Reinigung der Enzyme des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenasesystems aus Schweineleber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diplom-Biologe Burkhard Leidemann

aus Leverkusen

Düsseldorf 1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0027

# Auftrennung und Reinigung der Enzyme des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenasesystems aus Schweineleber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Diplom-Biologe Burkhard Leidemann**

aus Leverkusen

Düsseldorf 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. S. Hollmann

Korreferent: Prof. Dr. L. Birkofer

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 1980

Abkürzungen

| | |
|---|---|
| P450 | Cytochrom P450 |
| P420 | Cytochrom P420 |
| $b_5$ | Cytochrom $b_5$ |
| NADH | Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form |
| NADPH | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| FAD | Flavinadenindinukleotid |
| 2'-AMP | Adenosin-2'-phosphat |
| DCPIP | Dichlorphenolindophenol |
| EDTA | Äthylendiamintetraacetat |
| DTE | Dithioerythrit |
| Tris- | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| PEG | Polyäthylenglykol |
| DEAE | Diäthylaminoäthyl |
| DMF | Dimethylformamid |

Inhaltsverzeichnis


I. Einleitung 1

I.1. Mikrosomale Elektronentransportwege 1

I.2. Cytochrom P450 3

I.3. Cytochrom P450-Reduktase 7

I.4. Cytochrom $b_5$ und $b_5$-Reduktase 9

I.5. Organisation des Fremdstoffmonooxygenasesystems in der Membran 10

I.6. Ziel der Arbeit 11

II. Material und Methoden 13

II.1. Chemikalien 13

II.2. Proteinbestimmungen 14

II.3. Enzymbestimmungen 15

II.3.1. Cytochrom P450-Reduktase 15

II.3.2. Cytochrom $b_5$-Reduktase 15

II.3.3. Cytochrom P450 16

II.3.4. Cytochrom $b_5$ 16

II.4. Leitfähigkeitsmessungen 17

II.5. Isolierung der P450-Reduktase aus Rattenleber 18

II.5.1. Behandlung der Tiere 18

II.5.2. Mikrosomenpräparation 18

II.5.3. Solubilisierung und Protaminsulfatfällung 19

II.5.4. Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25 19

Seite

II.5.5. Chromatographie an 2'5'-ADP-Sepharose 4B 20

II.5.6.1. Darstellung von Hydroxylapatit 20

II.5.6.2. Einengen der Enzymlösung an Hydroxylapatit 22

II.5.7. Aufbewahrung des Enzyms 22

II.6. Isolierung der P450-Reduktase aus Schweineleber 23

II.6.1. Mikrosomenpräparation 23

II.6.2. Solubilisierung der Schweinelebermikrosomen 24

II.6.2.1. Solubilisierung mit Renex 690 und Desoxycholat 24

II.6.2.2. Solubilisierung mit Renex 690 und Ultraschall 25

II.6.3. Fraktionierung an DEAE-Sephadex A-50 25

II.6.3.1. Fraktionierung an DEAE-Sephadex im "batch"-Verfahren 25

II.6.3.2. Säulenchromatographische Fraktionierung an DEAE-Sephadex A-50 26

II.6.4.1. Darstellung von Calciumphosphatgel 27

II.6.4.2. Einengen an Calciumphosphatgel 27

II.6.4.3. Säulenchromatographische Auftrennung an Calciumphosphatgel 28

II.6.5. Fraktionierung an Hydroxylapatit 29

II.6.6.1. Darstellung von ω-Aminooctyl-Sepharose 6B 29

II.6.6.2. Fraktionierung an ω-Aminooctyl-Sepharose 6B 30

Seite

II.6.7. Fraktionierung an 2'5'-ADP-Sepharose 4B 30
II.6.8. Einengen der Reduktaselösung 31
II.6.9. Fraktionierung an Ultrogel ACA 34 31
II.6.10. Aufbewahrung des Enzyms 31

II.7. Isolierung des Fremdstoffmonooxygenasesystems aus Schweineleber 32
II.7.1. Solubilisierung des Monooxygenasesystems 32
II.7.2. Polyäthylenglykolfällungen 33
II.7.3. Auftrennung des Monooxygenasesystems an DEAE-Sephadex A-50 34 34

II.8. Reinigung von P450 I 34
II.8.1. Einengen von P450 I an Calciumphosphatgel 34
II.8.2.1. Darstellung von Anilin-Sepharose 4B 35
II.8.2.2. 1. Fraktionierung an Anilin-Sepharose 36
II.8.2.3. 2. Fraktionierung an Anilin-Sepharose 36
II.8.3. Fraktionierung an Hydroxylapatit 37
II.8.4. Absenkung der Renexkonzentration an Sephadex LH-20 37
II.8.5. Aufbewahrung von P450 Ib 37

II.9. Reinigung von P450 III 38
II.9.1. Einengen von P450 III an Calciumphosphatgel 38
II.9.2. Abtrennung von Cytochrom $b_5$ an Anilin-Sepharose 38
II.9.3. Abtrennung der $b_5$-Reduktase an Hydroxylapatit 39

Seite

II.9.4.1. Darstellung von Laurat-Sepharose 39
II.9.4.2. Fraktionierung an Laurat-Sepharose 41
II.9.5. Absenkung der Renexkonzentration an Sephadex LH-20 41
II.9.6. Aufbewahrung von P450 III 41

II.10. Reinigung von Cytochrom $b_5$ 42
II.10.1. Fraktionierung an DEAE-Sepharose CL-6B 42
II.10.2. Fraktionierung an Sephacryl S 200 Superfine 42
II.10.3. Aufbewahrung von Cytochrom $b_5$ 42

II.11. Reinigung der $b_5$-Reduktase 43
II.11.1. Fraktionierung an Blue Sepharose CL-6B 43
II.11.2. Fraktionierung an Sephacryl S 200 Superfine 43
II.11.3. Aufbewahrung der $b_5$-Reduktase 43

II.12. SDS-Gelelektrophorese 44

III. Ergebnisse 45

III.1. Isolierung von P450-Reduktase aus Rattenleber 45

III.2. Isolierung von P450-Reduktase aus Schweineleber 50
III.2.1. Mikrosomenpräparation 50
III.2.2. Solubilisierung der P450-Reduktase 52
III.2.3. Reinigung der P450-Reduktase 53

Seite

III.3. Isolierung der Enzyme des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenasesystems aus Schweineleber 64

III.3.1. Solubilisierung der Enzyme des Fremdstoffmonooxygenasesystems 64

III.3.2. Polyäthylenglykolfällungen 70

III.3.3. Auftrennung des Monooxygenase-systems an DEAE-Sephadex A-50 76

III.4. Reinigung von P450 I 80

III.5. Reinigung von P450 III 88

III.6. Reinigung von Cytochrom $b_5$ 95

III.7. Reinigung von $b_5$-Reduktase 99

III.8. Reinigung von P450-Reduktase 103

III.9. Zusammenschau der Reinigungen 104

IV. Diskussion 106

V. Zusammenfassung 117

VI. Literaturverzeichnis 119

# I. Einleitung

## I.1. Mikrosomale Elektronentransportwege

Das Endoplasmatische Reticulum der meisten Gewebe enthält Flavoproteine und Cytochrome, die zusammen ein Elektronentransportsystem bilden. Die Elektronen gelangen über reduzierte Pyridinnukleotide in das System hinein und werden in sauerstoffabhängigen Reaktionen verwendet.
Einen Überblick über die Elektronenwege und Endaktivitäten gibt Abbildung 1.

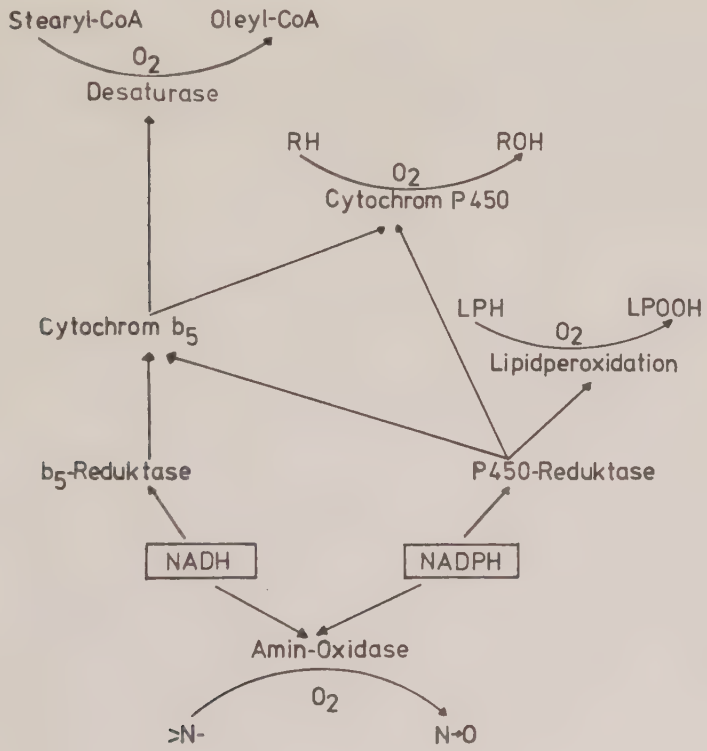



Abb. 1
Schematische Darstellung der mikrosomalen Elektronentransportwege nach Estabrook (1).

Die von NADH und NADPH stammenden Reaktionen werden in vier verschiedenen Reaktionen verbraucht:

a) Oxidation von Aminen
Die Amin-Oxidase ist ein Flavoprotein, das von beiden Pyridinnukleotiden reduziert werden kann. Es setzt sekundäre und tertiäre Amine um.
Neben diesen N-Oxidationen kann die Oxidase auch S-Oxidationen katalysieren. Bevorzugte Substrate sind dabei Thioharnstoff- und einige Sulfhydrylverbindungen (2).

b) Lipidperoxidation
Bei der Lipidperoxidation ist noch nicht endgültig geklärt, ob es sich um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt. Denkbar ist auch ein Reaktionsablauf an freiem reduziertem Eisen. Geklärt ist aber, daß die dazu nötigen Elektronen vom NADPH über die P450-Reduktase kommen (3).

c) Desaturierung von Fettsäuren
Die Reaktion wird von einem Nichthaemeisenprotein katalysiert, das vor seiner Isolierung (4) als Cyanid sensitiver Faktor bekannt war. Die benötigten Elektronen können von NADH und NADPH bereitgestellt werden, obligatorisch ist aber der Fluß dieser Elektronen über Cytochrom $b_5$.

d) Monooxygenierungen
Diese Reaktionen werden von Cytochrom P450 katalysiert. Es handelt sich um Hydroxilierungen mit molekularem Sauerstoff, bei denen ein Atom des Sauerstoffmoleküls zu Wasser reduziert wird, während das zweite in das Substratmolekül eingebaut wird. P450 gehört daher zu den Monooxygenasen. Umgesetzt werden eine große Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher endogener und exogener Substrate. Das Enzym ist von entscheidender Bedeutung für die Umsetzung von körperfremden lipophilen Verbindungen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Cytochrom P450, und den Enzymen, die an dessen Reduktion beteiligt sind. Dazu gehören: P450-Reduktase, Cytochrom $b_5$ und die $b_5$-Reduktase. Diese vier Enzyme werden zusammen als Monooxygenasesystem bezeichnet.

## I.2. Cytochrom P450

Der erste Nachweis von Cytochrom P450 gelang 1958 Klingenberg (5) und Garfinkel (6). Sie fanden in Lebermikrosomen ein Pigment, das nach Reduktion einen Komplex mit Kohlenmonoxid bildete. Der Komplex zeigte im Differenzspektrum einen Absorptionspeak bei 450 nm. Auf Grund dieser charakteristischen Eigenart wurde das Pigment dann als P450 bezeichnet.
Die CO-Komplexe bekannter Haemproteine weisen vergleichbare Maxima bei 420 nm auf. Die Zuordnung des entdeckten Pigments zu den Haemproteinen blieb daher zunächst strittig.
Hinweise für diese Zugehörigkeit lieferten einige Jahre später durch weitere spektrale Charakterisierungen Omura und Sato (7,8). Darüberhinaus zeigten sie, daß P450 nach Behandlung mit Desoxycholat in eine andere Form übergeht (9).
Diese verhält sich spektral wie andere Haemproteine auch und weist ein von 450 auf 420 nm verschobenes Maximum auf.
Sie wird daher als P420 bezeichnet.
P420 hat sich als ein enzymatisch inaktives Denaturierungsprodukt herausgestellt. Die Denaturierung kann nicht nur durch Desoxycholat, sondern auch durch andere oberflächenaktive Verbindungen, durch Lipasen und Proteasen, organische Lösungsmittel und hohe Salzkonzentrationen bewirkt werden (10).

Die Funktion des Enzyms im Organismus blieb zunächst unbekannt. Ein erstes Beispiel dafür lieferten dann Estabrook et al. (11). Sie demonstrierten, daß die $C_{21}$-Hydroxilierung von 17α-Hydroxiprogesteron in der Nebennierenrinde durch P450 katalysiert wird.

In der Folgezeit mehrten sich die Hinweise für die Beteiligung von P450 an der Umsetzung von Pharmaka. Orrenius et al. (12) zeigten, daß die N-Demethylierung von Aminopyrin in Lebermikrosomen mit Kohlenmonoxid gehemmt werden kann. Die Hemmung konnte auf photochemischem Wege, durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 450 nm, wiederaufgehoben werden (13).
Mehrere Stoffe , die als Substrate des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenasesystems bekannt waren, verursachten, wie Remmer et al (14) sowie Imai und Sato (15) zeigten, im Differenzspektrum von Lebermikrosomen charakteristische Veränderungen. Diese wurden später auch für endogene Substrate nachgewiesen (16,17).
Die beobachteten spektralen Veränderungen werden hervorgerufen durch Komplexbildung zwischen den Substratmolekülen und P450. Die Bildung eines solchen Komplexes ist obligatorisch für die Umsetzung eines Substrates durch das Fremdstoffmonooxygenasesystem und stellt den ersten Schritt der Umsetzung dar (18).

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion des Enzyms weckten ein reges Interesse an P450, doch leider blieben alle Isolierungsversuche zunächst erfolglos. Es gelang nicht, das Cytochrom aus der Membran des Endoplasmatischen Reticulums herauszulösen. Nach allen derartigen Versuchen konnte immer nur noch das enzymatisch inaktive P420 nachgewiesen werden.
Einen entscheidenden Fortschritt brachte dann die Beobachtung von Ichikawa und Yamano (19), daß Glycerin und andere Polyole in der Lage sind, das native Cytochrom zu stabilisieren. Danach konnten Lu und Coon (20) P450 in Gegenwart von Glycerin intakt solubilisieren. Nach Fraktionierungen konnten sie demonstrieren, daß zur Rekonstitution der Monooxygenaseaktivität drei Bestandteile nötig sind: P450, P450-Reduktase und Phospholipide (21).

Bis heute sind jedoch Isolierungen von P450 rar geblieben. Die ersten elektrophoretisch reinen P450-Fraktionen konnten 1974 von Imai und Sato (22) sowie von van der Hoeven et al. (23) isoliert werden. Beide Gruppen benutzten als Ausgangsmaterial für ihre Präparationen die Lebern von mit Pharmaka induzierten Kaninchen. Es folgten Isolierungen des Enzyms aus induzierten Rattenlebern (24,25).

Die Umsetzung eines Substrats durch P450 verläuft vermutlich, wie Abbildung 2 zeigt, in sechs Schritten.

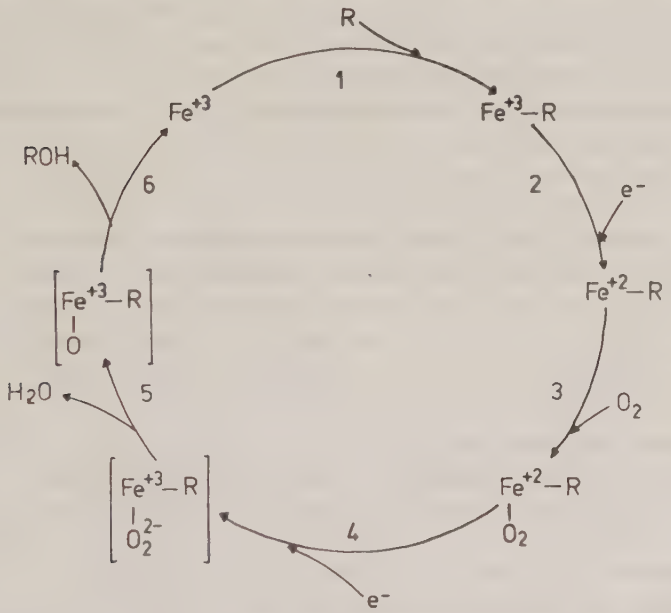



Abb. 2
Umsetzung eines Substrat R an P450, dargestellt nach Estabrook (26).

Im ersten Reaktionsschritt wird ein Substratmolekül reversibel an das oxidierte Cytochrom gebunden. Das Eisen im Porphyrinring geht dabei von der low spin- zur high spin-Form über. Daher kann man den Komplex im Differenzspektrum nachweisen.
Der zweite Schritt besteht aus der enzymatischen Reduktion des P450-Substratkomplexes durch die P450-Reduktase.
Im dritten Schritt bindet das reduzierte Cytochrom Sauerstoff. Damit ist ein ternärer Komplex von P450, Substrat und Sauerstoff gebildet.
Als nächstes erfolgt eine zweite Reduktion, die sowohl über die P450-Reduktase als auch über $b_5$ katalysiert werden kann.
Im fünften Schritt wird Wasser abgespalten. Dabei entsteht ein Oxen, das das gebundene Substrat angreift.
Abgeschlossen wird der Reaktionszyklus durch die Freisetzung des hydroxylierten Substrats. P450 liegt nun wieder in der oxidierten low spin-Form vor.
Beim dritten und vierten Reaktionsschritt ist ein Abruch der Reaktionsfolge unter Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten möglich. Dabei entständen Superoxid bzw. Peroxidanionen, während P450 jeweils reoxidiert würde. In beiden Fällen sollte man das Entstehen von $H_2O_2$ beobachten können. Tatsächlich kann man auch die Bildung von $H_2O_2$ bei P450 abhängigen Reaktionen verfolgen (26).

Eine große Fülle endogener und exogener Substrate kann von P450 auf diese Weise umgesetzt werden. Zu den endogenen gehören (27) : Fettsäuren, Steroidhormone, Gallensäuren und Haeme. Noch größer ist die Zahl der exogenen Substrate. Dazu gehören viele Pharmaka, Carcinogene, Insektizide und Herbizide (28) und weitere lipophile Verbindungen.
Als Reaktionen findet man Hydroxylierungen von aliphatischen und aromatischen Verbindungen, Dealkylierungen von Heteroatomen, Sulfoxidierungen, Epoxidierungen und Dehalogenierungen.
Manche Substrate werden sogar mehrfach umgesetzt. So kann Testosteron an mehreren Stellen hydroxyliert werden und

bei dem Pharmakon Chlorpromazin sind Sulfoxidierungen, N-Demethylierungen und Hydroxylierungen an mehreren Positionen des Phenothiazinkerns möglich (29).
Es ist einleuchtend, daß diese Reaktionsfülle nicht von einem einzigen Enzym bewältigt werden kann. Offenbar verbirgt sich hinter dem Namen P450 eine Reihe sehr ähnlicher Enzyme mit unterschiedlichen Aktivitäten.
Das wurde zunächst in Induktionsexperimenten deutlich. Wurden Ratten mit Phenobarbital oder mit 3-Methylcholanthren induziert, so konnte man in den Lebermikrosomen je nach Vorbehandlung verschiedene P450 nachweisen. Diese unterscheiden sich spektral in ihren CO-Differenzspektren (30,31) und in ihren Substratspezifitäten (32,33). Die gleichen Unterschiede zeigen sich auch an den gereinigten Proteinen und werden hier noch untermauert durch elektrophoretische (24,34) und immunologische Kriterien (35).
Die Heterogenität von P450 ist heute allgemein akzeptiert (36). Man schätzt, daß in Lebermikrosomen etwa 10 bis 15 verschiedene P450-Spezies vorhanden sind. Diese können nicht als Isoenzyme aufgefaßt werden, da sie völlig unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen.

## I.3. Cytochrom P450-Reduktase

Cytochrom P450-Reduktase (E.C. 1.6.2.4.) ist ein Flavoprotein. Aus historischen Gründen findet man sie auch als Cytochrom c-Reduktase bezeichnet. Das Enzym überträgt Elektronen von NADPH auf P450. Daneben ist auch noch die Reduktion von $b_5$ möglich.
Horecker (37) wies 1950 als erster das Enzym nach und reicherte es aus dem von einer Schweineleber gewonnenen Acetonpulver an. Nachdem man zunächst vermutete, daß die Reduktase am mitochondrialen Elektronentransport beteiligt sei, wiesen 1962 Williams und Kamin (38) sowie Phillips und Langdon (39) die Lokalisation des Enzyms im Endoplasmatischen

Reticulum nach. Das Vorkommen des Enzyms in diesem Zellkompartiment zeigte an, daß Cytochrom c, ein mitochondriales Protein, nicht das physiologische Substrat der Reduktase sein konnte. Vielmehr stellte sich die Beteiligung des Enzyms am mikrosomalen Elektronentransport heraus (40,41).

Seitdem ist das Enzym aus mehreren Organismen isoliert und von vielen Autoren untersucht und beschrieben worden.
Dabei sind neben einer großen Fülle von Daten hauptsächlich drei wichtige Fortschritte erzielt worden.
Durch Verwendung von Detergentien, statt proteolytischer Enzyme bei der Solubilisierung des Enzyms konnte die Reduktase in nativer Form isoliert werden (42,43). Im Gegensatz zum proteasebehandelten Enzym, das nur künstliche Elektronenakzeptoren reduziert, ist das mit Detergentien solubilisierte Enzym auch mit P450 aktiv und kann zur Rekonstitution des Fremdstoffmonooxygenasesystem verwendet werden.
Durch Anwendung von Affinitätschromatographie konnte die Isolierung der Reduktase wesentlich vereinfacht werden (44,45).
1973 beendeten Iyanagi und Mason (46) eine lange Diskussion über den Flavingehalt der Reduktase, indem sie nachweisen konnten, daß diese äquimolare Mengen von FAD und FMN enthält.
Pro Mol Enzym sind je ein Mol FMN und FAD vorhanden. Die Reduktase kann daher in fünf verschiedenen Red-Ox-Zuständen vorliegen.
Unteraeroben Bedingungen bildet die Reduktase ein stabiles Semichinon, wobei für jedes Reduktasemolekül ein NADPH benötigt wird. Dabei werden die beiden Elektronen von nur einem Flavin übernommen. Eines wird dann rasch an Sauerstoff unter Bildung von einem Superoxidanion weitergegeben und die Reduktase dabei zum Semichinon oxidiert (47).
Dieses Semichinon ist Voraussetzung für die weitere Katalyse, bei der vermutlich ein "shuttle" stattfindet zwischen dem Semichinon und einer Form des Enzyms, die drei Elektronen pro Reduktasemolekül enthält (48).

Der Mechanismus der Reduktion von P450 durch die Reduktase ist bisher allerdings noch nicht verstanden. Insbesondere die Rolle der beiden Flavine ist noch ungeklärt.

## I.4. Cytochrom $b_5$ und $b_5$-Reduktase.

Cytochrom $b_5$ kann sowohl von der NADH- als auch von der NADPH-abhängigen Reduktase reduziert werden. Im mikrosomalen Elektronentransportsystem ist es der einzige Schnittpunkt der Elektronenwege, die von den beiden Pyridinnukleotiden ausgehen. Die übernommenen Elektronen können von $b_5$ entweder auf die Fettsäure-Desatturase oder auf P450 übertragen werden.
Die Reduktion von P450 findet in zwei Ein-Elektronenschritten statt. Es wird vermutet, daß $b_5$ nur an der zweiten Reduktion beteiligt ist, im dargestellten Schema, Abbildung 2, ist dies Schritt vier.
Die Bedeutung des Elektronenflusses von NADH via $b_5$-Reduktase und $b_5$ auf P450 ist noch ungeklärt. Es ist bekannt, daß die P450-Reduktion in den Mikrosomen von NADPH ausgehend fünf mal schneller ist als die über NADH. Gleichzeitig ist die Konzentration an NADPH in der Mikrosomenfraktion wesentlich größer als die von NADH. Beide Argumente spechen dafür, daß diesem Reduktionsweg für P450 eine untergeordnete Bedeutung zukommt (49). Andererseits weiß man, daß die NADPH-abhängige P450-Aktivität in Anwesenheit von NADH beschleunigt wird. Diese Beschleunigung ist zuerst von Conney et al. (50) beschrieben worden und wird als NADH-Synergismus bezeichnet.

Cytochrom $b_5$ ist aus den Lebern mehrerer Organismen, darunter Kaninchen, Ratte, Schwein, Kalb und Pferd, isoliert worden. Die bestehenden Isolierungen bauen auf die Methode von Spatz und Strittmatter auf (51).

Die Cytochrom $b_5$-Reduktase (E.C.1.6.2.2.) katalysiert den Elektronenübergang von NADH auf Cytochrom $b_5$.
Ebenso wie die NADPH-abhängige Reduktase ist es ein Flavo-

protein. Im Gegensatz zu dieser enthält es nur ein Flavin, nämlich FAD.
Die Enzympräparation des Enzyms in Gegenwart von Detergentien wurde von Spatz und Strittmatter (52) erarbeitet.

## I.5. Organisation des Fremdstoffmonooxygenasesystems in der Membran

Die Mikrosomenfraktion wird aus Proteinen und Lipiden im Verhältnis 3 : 1 (53) aufgebaut. Die dominierende Proteinkomponente ist P450, das bei induzierten Organismen bis zu einem Anteil von 20 % am Gesamtproteingehalt von Lebermikrosomen beteiligt ist. Der Vergleich mit der P450-Reduktase zeigt ein Verhältnis von 20 : 1 zugunsten von P450 (54).

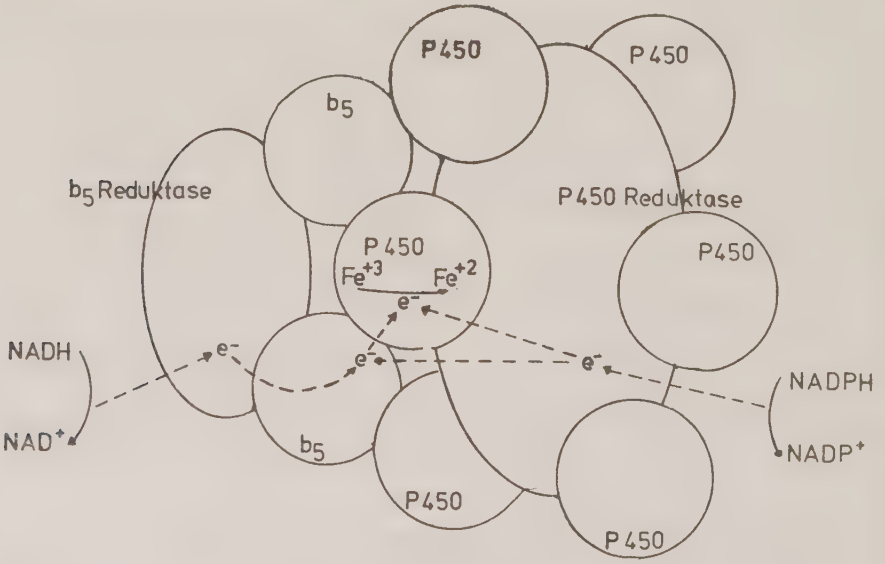



Abb. 3
Mögliche Organisation des Fremdstoffmonooxygenasesystems nach Estabrook (54).

Die Kinetik der P450-Reduktion durch die Reduktase verläuft in einer biphasischen Reaktion, in einer schnellen und einer langsamen (55). Daraus schließt man, daß ein Teil der Cytochrome sich in unmittelbarer Nachbarschaft eines Reduktasemoleküls befindet und daher schnell reduziert wird, während andere, die nicht in solche Komplexe eingebaut sind, nur langsam reduziert werden.
Abbildung 3 zeigt, wie man sich den Aufbau eines solchen Komplexes vorstellen kann.

## I.6. Ziel der Arbeit

Das mikrosomale Fremdstoffmonooxygenasesystem ist zu einem Schwerpunkt der biochemischen Forschung geworden. Im Vordergrund der Interessen steht dabei neben Untersuchungen, die dem Elektronentransport- und Reaktionsmechanismus gelten, das weite Feld der Cancerogenese, des Umweltschutzes und der Umsetzung von Pharmaka.
Die überwiegende Zahl der Experimente dazu war bisher an Tierversuche oder an Versuche mit der isolierten Mikrosomenfraktion gebunden. Dabei sind die Aussagemöglichkeiten durch die biologische Streuung und die Komplexität des Systems begrenzt. Angestrebt wird daher eine weitere Vereinfachung des zu untersuchenden Systems, im Idealfall, eine Rekonstitution des Fremdstoffmonooxygenasesystems aus den gereinigten Proteinen in Lipidmembranen.
Seit die Isolierung einzelner P450-Enzyme gelungen ist, versucht man diesen Plan zu verwirklichen (55,56,57).
Die bisher bekannten Systeme beschränken sich auf P450 und die P450-Reduktase, die dazu aus dem gleichen Ausgangsmaterial angereichert werden. Cytochrom $b_5$ und die $b_5$-Reduktase sind dabei noch nicht einbezogen worden.
Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methodik zu entwickeln, die eine gleichzeitige Isolierung aller vier

am Fremdstoffmonooxygenasesystem beteiligten Enzyme aus einem Ausgangsmaterial ermöglicht. Das sind Cytochrom P450 und $b_5$ sowie die beiden zugehörigen Reduktasen, P450- und $b_5$-Reduktase.
Darüberhinaus wird eine Präparation der Enzyme aus einem nicht induzierten Organismus angestrebt. Die Kenntnisse über P450 aus nicht induzierten Organismen sind bisher wegen der schwierigen Aufarbeitung gering. Isolierungen bis zur elektrophoretischen Reinheit sind noch nicht durchgeführt worden. Selbst weitgehende Anreicherungen sind rar geblieben und beschränken sich auf die Arbeiten von Philpot und Arinc (58) und Gibson und Schenkman (59), die P450 aus Kaninchen- bzw. aus Rattenleber angereichert haben.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methodik soll dann ein Lipidvesikelsystem aufgebaut werden, das ein vollständiges Fremdstoffmonooxygenasesystem enthält. Daran sollen Untersuchungen zu den molekularen Vorgängen bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung vorgenommen werden.

## II. Material und Methoden

### II.1. Chemikalien

DEAE-Sephadex A-25, DEAE-Sephadex A-50, Sepharose 4B, Sepharose 6B, Sephacryl S-200 Superfine, Sephadex G-100 Superfine, 2'5'-ADP-Sepharose 4B, Blaue Sepharose CL-6B, Sephadex LH-20, Pharmacia, Freiburg.

Ultrogel ACA 34, LKB Instrument, Gräfelfing.

Bio-Beads SM-2, Bio-Rad Laboratories, München.

NADH, NADPH, FMN, Boehringer, Mannheim.

Serumalbumin vom Rind, Behring, Marburg.

Protaminsulfat, Dithioerythrit, Polyäthylenglykol 6000, Serva, Heidelberg.

2'-AMP, Cytochrom c, Sigma, München.

Cholsäure, Natriumcholat, Natriumdesoxycholat, Triton X-100, Merck, Darmstadt.

Renex 690, Polyoxyäthylen-(10)-Nonylphenoläther, war ein Geschenk der Atlas-Chemie, Essen.

Alle anderen Chemikalien wurden mit höchstem Reinheitsgrad in der handelsüblichen Form bezogen und, sofern nicht anders beschrieben, ohne weitere Vorreinigung verwendet.

II.2.Proteinbestimmungen

Die Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Goa (60) und in verdünnten Lösungen nach Lowry (61) durchgeführt.

Proteinbestimmung nach Goa:
Ein Aliquot der Probe wurde so mit 3 %iger Natronlauge verdünnt, daß eine Proteinkonzentration von 0,1 bis 0,2 mg/ml erreicht wurde. Je 4 ml dieser Verdünnung wurden mit 0,2 ml Benedict-Reagenz versetzt. Nach 30 Minuten wurde die Extinktion bei 334 nm in einem Eppendorf-Photometer gegen einen gleich behandelten Blindwert ohne Protein abgelesen. Die Proteinkonzentration wurde dann aus einer mit Rinderserumalbumin unter gleichen Bedingungen gefertigten Eichkurve ermittelt.

Proteinbestimmung nach Lowry:
0,8 ml Probe wurden mit 0,2 ml 2,5 N Natronlauge versetzt und mit 4 ml Reagenz A gemischt. Nach 10 Minuten wurde 1 ml Reagenz B zugegeben und erneut gemischt. Die entstandene Blaufärbung wurde im Eppendorf-Photometer gegen einen gleich behandelten Blindwert ohne Protein bei 691 nm gemessen. Auch hier wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin unter gleichen Bedingungen angefertigt.

Reagenz A: 1 ml Natrium-Kalium-Tartrat-Lösung( 3,3g Tartrat in 100 ml dest. Wasser ) und 1 ml Kupfersulfat-Lösung ( 1,25 g in 100 ml dest. Wasser) wurden in einen 100 ml-Meßkolben pipettiert, der mit Natriumkarbonatlösung ( 25 g ad 1000 ml) bis zur Eichmarke aufgefüllt wurde. Das Reagenz wurde jeden Tag frisch angesetzt.

Reagenz B: 22,73 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz ad 100 ml

## II.3. Enzymbestimmungen

### II.3.1. Cytochrom P450-Reduktase

Die Aktivität der NADPH abhängigen Cytochrom P450-Reduktase ( EC 1.6.2.4. ) wurde, wie bei Yasukochi und Masters (44) beschrieben, mit Dichlorphenolindophenol ( DCPIP ) als Elektronenakzeptor in einem Spektralphotometer DB-GT ( Beckman ) bei 600 nm bestimmt. Der Molare Extinktionskoeffizient des oxydierten Farbstoffs bei 600 nm beträgt nach Stein-Parve und Beinert (62) 21 x $10^3$ $M^{-1}$ x $cm^{-1}$.
Beim isolierten Enzym wurde neben DCPIP auch Cytochrom c als Substrat eingesetzt. Dabei wurde für das Cytochrom c bei 550 nm nach Williams und Kamin (38) ein Molarer Extinktionskoeffizient von 21 x $10^3$ $M^{-1}$x $cm^{-1}$ zugrunde gelegt.

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 1 ml :
0,3 x $10^{-3}$ Mol Kaliumphosphat, eingestellt auf pH 7,7,
9,6 x $10^{-8}$ Mol DCPIP bzw. 4 x $10^{-8}$ Mol Cytochrom c.
Dazu wurde ein Aliquot Enzymlösung und 0,1 ml $10^{-3}$ M NADPH-Lösung gegeben und die Reaktion damit gestartet.
Alle Aktivitätsmessungen wurden bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt.
Diejenige Enzymmenge, die unter obigen Bedingungen in einer Minute 1 µMol DCPIP bzw. Cytochrom c umsetzt, wird als eine Aktivitätseinheit ( AE ) definiert.

### II.3.2. Cytochrom $b_5$-Reduktase

Die NADH abhängige Cytochrom $b_5$-Reduktase ( EC 1.6.2.2. ) wurde über die Reduktion von Ferricyanid gemessen.
Der Molare Extinktioskoeffizient von Ferricyanid beträgt bei 420 nm 1,02 x $10^3$ $M^{-1}$x $cm^{-1}$ (63).
Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 2 ml :
0,2 x $10^{-3}$ Mol Kaliumphosphat, eingestellt auf pH 7,5,
2 x $10^{-6}$ Mol Kaliumhexacyanoferrat,
0,1 x $10^{-7}$ Mol NADH.

Dazu wurde ein Aliquot Enzymlösung gegeben.
Der Test wurde bei 25°C durchgeführt und bei 420 nm mit einem Spektralphotometer DB-GT (Beckman) verfolgt.
Eine Aktivitätseinheit (AE) wurde als diejenige Enzymmenge definiert, die unter den genannten Bedingungen in einer Minute 1 µMol Ferricyanid umsetzt.

II.3.3. Cytochrom P450

Cytochrom P-450 wurde nach Omura und Sato (9) aus dem Differenzspektrum des reduzierten CO-Komplexes gegen das reduzierte Cytochrom bestimmt.
In zwei Halbmikroküvetten wurden je 1 ml Meßlösung eingefüllt. Beide Lösungen wurden mit einigen Körnchen Dithionit reduziert und dann im Trübungszusatz des Spektralphotometers ACTA III (Beckman) im Bereich von 500 bis 420 nm gegeneinander gemessen. Die Probenküvette wurde anschließend 20 Sekunden lang mit Kohlenmonoxid begast und noch einmal gegen die unbegaste Referenzlösung im gleichen Spektralbereich gemessen.
Die P-450-Konzentration wurde aus der Extinktionsdifferenz $E_{450} - E_{490}$ unter Berücksichtigung der zuerst aufgenommenen Grundlinie berechnet. Der Molare Extinktionskoeffizient beträgt dafür 91 x $10^3$ $M^{-1}$x $cm^{-1}$ (9).

II.3.4. Cytochrom $b_5$

Cytochrom $b_5$ wurde in Anlehnung an die Methode von Omura und Sato (9) bestimmt. Dabei wurde im Differenzspektrum enzymatisch reduziertes gegen oxydiertes $b_5$ gemessen. Abweichend von Omura und Sato wurde zur Reduktion nur ein Zehntel der angegebenen NADH-Menge eingesetzt, da dessen Randabsorption die Messung bei 409 nm störte.
In 2 Halbmikroküvetten wurden je 1 ml der zu messenden Lösung einpipettiert und davon wurde eine Grundlinie von 400 bis 450 nm aufgenommen. Auch diese Messung wurde im

Trübungszusatz des Spektralphotometers ACTA III (Beckman) durchgeführt. In die Probenküvette wurden 10 µl einer 2 mM NADH-Lösung gegeben und dann wurde das Differenzspektrum über der Grundlinie gefahren.
Die $b_5$-Konzentration errechnet sich aus der Extinktionsdifferenz von $E_{424} - E_{409}$ mit Hilfe des Molaren Extinktionskoeffizienten von 185 $M^{-1} \times cm^{-1}$ (9).
Da $b_5$ von NADH nicht direkt, sondern nur über die Reduktasen reduziert werden kann, muß bei reinen, reduktasefreien $b_5$-Fraktionen Reduktaseaktivität im Test zugesetzt werden. Dafür wurde eine angereicherte $b_5$-Reduktase-Lösung benutzt. Die spezifische Aktivität dieser Lösung lag bei 100 AE/mg Protein. Pro Bestimmung wurden je 1 AE in einem Volumen von 10 µl zugegeben.

II.4. Leitfähigkeitsmessungen

Alle erforderlichen Leitfähigkeitsmessungen wurden mit dem Leitfähigkeitsmeßgerät Modell LF 39 T (Wissensch. Techn. Werkstätten, Weilheim/Obb.) vorgenommen. Dabei wurde die Meßzelle LTA 100 verwendet, deren Zellkonstante 1,00 $cm^{-1}$ beträgt.

## II.5. Isolierung der P450-Reduktase aus Rattenleber

Die P-450-Reduktase wurde nach einer Vorschrift von Dignam und Strobel (45) aus den Lebern von mit Phenobarbital induzierten Ratten isoliert.

### II.5.1. Behandlung der Tiere

Versuchstiere waren weibliche Wistarratten, etwa 200 g schwer, aus eigener Zucht.
Den Tieren wurde vier Tage lang täglich Phenobarbital-Natrium, 100 mg/kg Körpergewicht in 0,9 % NaCl-Lösung, intraperitoneal injiziert. 24 Stunden vor der Tötung wurde ihnen das Futter entzogen.

### II.5.2. Mikrosomenpräparation

Den Ratten wurde unter Äthernarkose der rechte Vorhof des Herzens geöffnet und eine Braunüle G 18 ( Braun, Melsungen ) über den rechten Vorhof in die Vena cava inferior bis oberhalb der Leber vorgeschoben. Die untere Hohlvene wurde zwischen Niere und Leber abgebunden und die Pfortader durchtrennt. Dann wurde die Leber in situ über die Braunüle mit kalter 0,154 M KCl-Lösung bis zur Blutfreiheit perfundiert und anschließend excidiert.
Die Leber wurde nach Entfernen von Bindegewebsresten mit KCl-Lösung gewaschen und anschließend zwischen zwei Lagen Filterpapier getrocknet und gewogen. Mittels einer Schere wurde sie dann zerkleinert und mit der vierfachen Menge kalter KCl-Lösung versetzt, und in einem Teflon-Glas-Homogenisator ( Potter-Elvehjem, 0,3 mm Toleranz zwischwen Glaswand und Teflonstempel ) zwei Minuten lang bei 700 Upm homogenisiert.
Das gewonnene Homogenat wurde in einer Sorvall-Kühlzentrifuge ( Typ RC 2-B ) zunächst 10 Minuten bei 755 g und danach 20 Minuten bei 14.500 g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und die im Überstand befindlichen Mikrosomen wurden durch eine einstündige Zentrifugation bei 105.000 g

in einer Ultrazentrifuge ( Typ Spinco L 2, Beckman ) sedimentiert.
Das Sediment wurde in 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE und 30 %ig an Glycerin, so aufgenommen, daß die Proteinkonzentration 10 mg/ml betrug.

Alle weiteren Arbeitsgänge erfolgten im Kühlraum bei einer Temperatur von 4° C.

II.5.3. Solubilisierung und Protaminsulfatfällung

Zur Ablösung der Enzyme aus der Membran wurde das nicht-ionische Detergens Renex 690 benutzt.
Die Mikrosomensuspension wurde tropfenweise mit einer 10 %igen Renexlösung versetzt, bis eine 1,4 %ige Renexkonzentration erreicht war. Nach beendeter Zugabe wurde noch 20 Minuten gerührt, dann wurde eine 1,5 %ige Protaminsulfatlösung zugetropft und wiederum 20 Minuten gerührt. Pro Gramm mikrosomalen Proteins wurden 2,1 ml Protaminsulfatlösung eingesetzt.
Durch eine einstündige Zentrifugation bei 105.000 g in der Ultrazentrifuge wurden die solubilisierten Enzyme von den Membranpartikeln abgetrennt. Der Überstand dieser Zentrifugation wird als solubilisierte Mikrosomenfraktion bezeichnet.

II.5.4. Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25

Die solubilisierte Fraktion wurde unmittelbar nach der Zentrifugation auf eine DEAE-Sephadex A-25 -Säule, 3 x 50 cm, äquilibriert mit 0,1 M Tris-Puffer, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 20 %ig an Glycerin und 0,15 %ig an Renex 690, aufgetragen.
Mit dem gleichen Puffer wurde die Säule nach beendeter Probenaufgabe gewaschen, bis das Eluat proteinfrei war.
Die Ablösung der gebundenen Proteine erfolgte in einem linearen KCl-Gradienten, der mit Hilfe eines Ultrograd-Gradientenmischers ( LKB-Instruments) hergestellt wurde. Die KCl-Endkonzentration betrug 0,4 M.

II.5.5. Chromatographie an 2'5'-ADP-Sepharose 4B

Diese Affinitätschromatographie wurde nach der Methode von Yasukochi und Masters durchgeführt (44).
2'5'-ADP-Sepharose 4B wurde in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,7, gequollen und mehrfach durch Dekantieren gewaschen. Die Äquilibrierung erfolgte in der Säule, 0,7 x 12 cm, mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,7, 0,02 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 20 %ig an Glycerin und 0,1 %ig an Renex 690.
Die durch Ionenaustauschchromatographie vorgereinigte Enzymfraktion wurde nach Dialyse gegen den benutzten Äquilibrierungspuffer auf die Säule aufgetragen. Mit dem gleichen Puffer wurde die Säule dann gewaschen. Anschließend wurde die Phosphatkonzentration in der Lösung auf 0,2 M gesteigert und schließlich wurde noch Desoxycholat in einer 0,1%igen Konzentration zugegeben. Von allen drei Lösungen wurde dabei je ein Volumen von 50 ml verbraucht.
Die gebundene Reduktase konnte dann spezifisch mit 2'-AMP, 0,7 mM in Äquilibrierungspuffer, vom Affinitätsgel gelöst werden.
Nach Gebrauch wurde das Gel mit 2 M NaCl-Lösung, 0,1 %ig an Natriumazid, regeneriert.

II.5.6.1. Darstellung von Hydroxylapatit

Hydroxylapatit wurde nach der Methode von Levin (63) dargestellt. Die Darstellung erfolgte, wie bei Mazin et al.(64) beschrieben, in Gegenwart von Silica Gel, das für das Hydroxylapatit Kristallisationskeime liefert. Dadurch gewinnt man größere Hydroxylapatitkristalle, die einen besseren Gebrauch bei der Säulenchromatographie ermöglichen.
0,25 g Kieselgel HF nach Stahl, mittlere Korngröße 10 - 40 $\mu$, wurden über Nacht in 50 ml Wasser gequollen. Am nächsten Morgen wurde das Wasser dekantiert und durch frisches ersetzt. Dieser Vorgang wurde innerhalb einiger Stunden noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Kieselgel in 25 ml Wasser

suspendiert und zu 100 ml Wasser in einen emaillierten 3 l Kochtopf gegeben. Über eine Schlauchpumpe wurden nun gleichzeitig mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/h je 1 l 0,5 M $CaCl_2$- und 0,5 M $Na_2HPO_4$-Lösung zugegeben. Während der Zugabe wurde die Suspension durch einen Rührmotor mit kleinst möglicher Geschwindigkeit gerührt.
Nach beendeter Zugabe wurde der Rührvorgang gestoppt und der Überstand mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der Niederschlag wurde auf die gleiche Weise 6 mal mit je 2 l Wasser gewaschen. Das Absaugen erfolgte erst dann, wenn sich das gesamte Material gesetzt hatte.
Zum gewaschenen Bruschit wurden 1,5 l Wasser und 50 ml frisch angesetzte 40 %ige NaOH gegeben. Die Suspension wurde dann auf einer Kochplatte erhitzt. Diese wurde so reguliert, daß der Siedepunkt nach 45 Minuten erreicht wurde. Anschließend wurde der Kochvorgang eine Stunde fortgesetzt. Das Kochen sollte dabei nicht zu heftig werden, da dann die empfindlichen Kristalle beschädigt werden können.
Nach einstündigem Kochen wurde der trübe Überstand abgesaugt, sobald sich das Apatit gesetzt hatte. Dann wurden 2 l Wasser zugegeben, 5 Minuten gerührt und nach weiteren 5 Minuten wurde wiederum abgesaugt. Dieser Arbeitsgang wurde noch 3 mal wiederholt.
Nach dem vierten Waschen wurde dann statt Wasser 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8, zugegeben. Unter Rühren wurde die Aufschwemmung gerade solange erhitzt, bis das Sieden einsetzte. Der Rührer wurde sofort abgeschaltet und der Topf von der Kochplatte genommen. Nach 5 Minuten wurde der Überstand wieder abgesaugt. Dieser Vorgang wurde mit dem gleichen Puffer noch 2 mal durchgeführt und anschließend mit zehnfach verdünntem Puffer 3 mal wiederholt.
Damit war die Präparation abgeschlossen.Das Hydroxylapatit wurde im Kühlraum in 0,001 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8, aufbewahrt.

II.5.6.2. Einengen der Enzymlösung an Hydroxylapatit

Die Peak-Fraktionen der Affinitätssäule wurden vereinigt und über Nacht gegen 2 l 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,4, 10 %ig an Glycerin, 0,1 %ig an Renex 690 und 1 mM an EDTA dialysiert. Die dialysierte Fraktion wurde auf eine mit Dialysepuffer äquilibrierte Hydroxylapatitsäule, 1 x 3 cm, aufgetragen. Eluiert wurde die Reduktase anschließend mit 0,3 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,7, 20 %ig an Glycerin, 0,1 %ig an Renex 690 und 0,1 mM EDTA.
Bei diesem Einengungschritt wurde gleichzeitig eine Abtrennung des bei der Affinitätschromatographie benutzten 2'-AMP erreicht.

II.5.7. Aufbewahrung des Enzyms

Die nach der Affinitätschromatographie vereinigten Enzymfraktionen wurden bei -20° C in der Kühltruhe eingefroren. Nach zweijähriger Lagerung konnte keine Aktivitätsabnahme festgestellt werden.
An Hydroxylapatit eingeengtes Enzym wurde unter den gleichen Bedingungen gelagert. Nach 6 Wochen war noch keine Abnahme der Aktivität feststellbar.

## II.6. Isolierung der P450-Reduktase aus Schweineleber

### II.6.1. Mikrosomenpräparation

Die Aufarbeitung der Schweineleber erfolgte in Anlehnung an die Methode von Yasukochi und Masters (44).
Die Schweineleber wurde vom Schlachthof Düsseldorf bezogen. Sie wurde den Tieren möglichst rasch nach dem Töten entnommen, sofort in Eis gekühlt und darin bis zum Erreichen des Labors aufbewahrt. Hier wurde die Leber dann mit physiologischer KCl-Lösung, 0,154 M, möglichst blutfrei perfundiert. Bei der Perfusion wurde pro Leber etwa ein Volumen von 1,5 l KCl-Lösung gebraucht.
Die perfundierte Leber wurde, wenn möglich, sofort weiterverarbeitet oder in Portionen von etwa 300 g aufgeteilt und in der Kühltruhe bei -26°C eingefroren. In dieser Form kann das Material mehrere Wochen aufbewahrt werden. Wenn allerdings auch das Cytochrom P450 isoliert werden soll, empfiehlt es sich die Leber rasch aufzuarbeiten, da unter den angegebenen Aufbewahrungsbedingungen eine zunehmende Denaturierung zum P420 festgestellt wurde.

Die Leber wurde in Streifen geschnitten und dann weiter in einer Moulinette bis zu einer breiartigen Konsistenz zerkleinert. Diese breiige Lebermasse wurde mit der dreifachen Menge physiologischer KCl-Lösung versetzt und in einem Starmix bei höchster Drehzahl so lange weiterhomogenisiert, bis keine ganzen Leberpartikel mehr sichtbar waren.
Abweichend von Yasukochi und Masters (44) wurde bei diesen Aufarbeitungsgängen statt einer Saccharoselösung physiologische KCl verwendet, weil dadurch geringere Verunreinigungen der Mikrosomenfraktion durch Hämoglobin erreicht werden.

Das Homogenat wurde in der Kühlzentrifuge, Sorvall RC-2B, 40 Minuten bei 13.200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und mit der 2,5fachen Menge kaltem Wasser versetzt. Durch Zugabe von $CaCl_2$ wurden die Mikrosomen dann,

wie bei Cinti et al. (65) beschrieben, gefällt.
Dabei wurde 0,8 M $CaCl_2$-Lösung tropfenweise bis zu einer 8 mM Endkonzentration zu dem verdünnten Überstand gegeben. Anschließend wurde noch 30 Minuten in der Kälte gerührt und die ausgefällten Mikrosomen dann durch eine einstündige Zentrifugation bei 16.700 g in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Der rot gefärbte, klare Überstand, der einen großen Teil des Hämoglobins enthält, wurde verworfen und das Sediment in 0,1 M Pyrophosphatpuffer, pH 7,4, 1 mM EDTA, aufgenommen und eine Stunde in der Ultrazentrifuge bei 105.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mehrfach mit Pyrophosphatpuffer gewaschen. Das gewaschene Sediment kann für mehrere Tage bei -20°C Kühltruhe eingefroren werden, ohne daß Enzymverluste eintreten.

II.6.2. Solubilisierung der Schweinelebermikrosomen

Beim Herauslösen der Reduktase aus der Membranfraktion wurden verschiedene Verfahren erprobt, da sich die bei den Rattenlebermikrosomen angewendete Solubilisierung nur mit Renex 690 nicht bewährte.

II.6.2.1. Solubilisierung mit Renex 690 und Desoxycholat

Dieses Verfahren wurde wie bei Yasukochi und Masters beschrieben angewendet (44).
Die eingefrorenen Mikrosomensedimente wurden in 0,01 M Trispuffer, mit Essigsäure auf pH 7,4 eingestellt, 0,1 mM EDTA und 20 %ig an Glycerin, so aufgenommen, daß eine Proteinkonzentration von 25 mg/ml erreicht wurde. Dazu wurden schnell hintereinander unter Rühren 1/5 Volumenteil 10 %ige Renexlösung , 1/5 Volumenteil 5 %ige Desoxycholatlösung und 3/5

Volumenteile 20 %ige Glycerinlösung, 0,1 mM DTE, zugegeben. Die Endkonzentrationen betragen dann: Protein 12,5 mg/ml, Renex 690 1 %ig, Desoxycholat 0,5 %ig und Glycerin 16 %ig. Nach beendeter Zugabe wurde die Suspension noch 30 Minuten gerührt und schließlich 1 Stunde bei 48.000 g zentrifugiert. Die solubilisierten Enzyme werden dann im Uberstand gewonnen.

II.6.2.2. Solubilisierung mit Renex 690 und Ultraschall

Die Mikrosomen wurden, wie bei II.6.2.1. beschrieben, in Puffer aufgenommen. Dann wurde eine 10 %ige Renexlösung zugetropft. Pro 50 mg mikrosomalen Proteins wurde je 1 ml der Detergentienlösung zugegeben, sodaß ein Renex/Protein-Verhältnis von 2 : 1 eingestellt wurde. Die Suspension wurde anschließend noch 20 Minuten lang gerührt und während dieser Zeit 4 mal für je 2 Minuten mit Ultraschall (Sonorex RK 100, Bandelin) beschallt. Die Trennung der solubilisierten Proteine von der Membranfraktion erfolgte wiederum durch eine einstündige Zentrifugation bei 48.000 g.

II.6.3. Fraktionierung an DEAE-Sephadex A-50

Die Fraktionierung an DEAE-Sephadex A-50 wurde sowohl säulenchromatographisch als auch im "batch"-Verfahren auf verschiedene Arten im Anschluß an die Solubilisierung durchgeführt.

II.6.3.1. Fraktionierung an DEAE-Sephadex A-50 im "batch"-Verfahren

Der Ionenaustauscher wurde mit 0,025 M Trispuffer, pH 7,7, 0,8 % Renex 690, 0,1 % Natriumdesoxycholat, 10 % Glycerin und 0,05 mM EDTA und DTE, äquilibriert.

Der äquilibrierte Ionenaustauscher wurde in die solubilisierte Proteinfraktion eingerührt. Dabei wurde pro Gramm mikrosomalen Proteins ein Gelbettvolumen von 250 ml eingesetzt. Anschließend wurde noch 20 Minuten gerührt, um die Einstellung des Gleichgewichts zu gewährleisten, und dann wurde das beladene Gel auf einer Nutsche abgetrennt. Der Überstand wurde bei schwachem Unterdruck abgesaugt, ohne das Gel trocken zu saugen. Der feuchte Austauscher wurde wieder mit Äquilibrierungspuffer aufgeschwemmt und nachdem sich das Gel gesetzt hatte, wurde der Überstand wiederum abgenutscht. Dies wurde so lange wiederholt, bis das in den ersten Waschgängen trübe Eluat klar und farblos blieb. Insgesamt erfordert dieser Schritt bei einer Ausgangsmenge von 6 g mikrosomalen Proteins und einem eingesetztem Gelbettvolumen von 1.500 ml einen Einsatz von 3 bis 4 l Puffer in 4 bis 5 Waschgängen. Das Waschen des Ionenaustauschers wurde dann mit Äquilibrierungspuffer, 0,15 M KCl, fortgesetzt, bis auch dieses Eluat farblos blieb. Dazu waren wieder etwa 3 l Puffer nötig.
Die Reduktase wurde dann mit Äquilibrierungspuffer, 0,4 M KCl, von dem Gel abgelöst. Beim ersten Waschen mit diesem Puffer wurden nur 300 ml eingesetzt; dieses Eluat wurde verworfen. Die weiteren Eluate wurden so lange gesammelt, bis keine Reduktaseaktivität mehr darin enthalten war. Erforderlich dazu waren meist 4 Waschgänge mit je 500 ml Puffer.

### II.6.3.2. Säulenchromatographische Fraktionierung an DEAE-Sephadex A-50

DEAE-Sephadex A-50 wurde wie oben beschrieben äquilibriert, anschließend entlüftet und zum Gießen der Säule (5 x 50 cm) verwendet.
Auf diese Säule wurde die solubilisierte Mikrosomenfraktion

aufgetragen. Die Elution erfolgte durch verschieden geformte Gradienten zwischen 0 und 0,4 M KCl in Äquilibrierungspuffer oder durch stufenweise Elution mit 0,15 M sowie 0,32 M KCl, ebenfalls in Äquilibrierungspuffer.
Bei einem Teil der Chromatographien wurden Elutionslösungen gebraucht, die zusätzlich 10 % Glycerin und kein Desoxycholat enthielten.

### II.6.4.1. Darstellung von Calciumphosphatgel

Calciumphosphatgel wurde nach der Methode von Keilin und Hartree (66) dargestellt.
150 ml einer 0,6 M $CaCl_2$-Lösung wurden mit Wasser bis zu einem Volumen von 1.600 ml aufgefüllt. Dann wurden 150 ml 0,4 M Trinatriumphosphatlösung zugegeben und der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt. Der beim Zusammengießen der beiden Lösungen ausfallende Niederschlag von Calciumphosphatgel wurde mit etwa 20 l Wasser durch Dekantieren gewaschen und dann niedertourig abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, aufgenommen, wiederum zentrifugiert und dann erneut in dem Puffer suspendiert. Die Ausbeuten an Calciumphosphatgel liegen bei 9 g.

Nach Gebrauch wurde das Gel jeweils verworfen, da sich eine Regenerierung angesichts der einfachen Darstellung nicht lohnt.

### II.6.4.2. Einengen an Calciumphosphatgel

Proteinlösungen wurden an Calciumphosphatgel, wie bei Vermilion und Coon beschrieben (67), eingeengt.
In die Proteinlösung wurde eine Suspension von Calciumphosphatgel eingerührt. Für 100 mg Protein wurde dabei etwa 1 g Calciumphosphat eingesetzt. Nach der Zugabe wurde noch 20 Minuten gerührt, ehe das Gel 10 Minuten bei 8.000 g abzentrifugiert wurde. Der reduktasefreie Überstand wurde verworfen,

während das Sediment in 0,15 M Kaliumphosphatphatpuffer, pH 7,4, 0,1 %ig an Renex 690, aufgenommen wurde. Pro Gramm eingesetztem Calciumphosphatgel wurden dabei 25 ml des Puffers aufgewendet. Die Suspension wurde bis zur Homogenität gerührt und wiederum zentrifugiert. Der gelb gefärbte Überstand, der die abgelösten Proteine enthielt, wurde abgegossen und das Sediment in gleicher weise noch einmal mit dem Phosphatpuffer gewaschen.
Die beiden gewonnen Überstände, die die Reduktase in hoher Ausbeute enthielten, wurden vereinigt.

II.6.4.3. Säulenchromatographische Auftrennung an Calciumphosphatgel

Wegen der schlechten Durchflußeigenschaften von Calciumphospgatgelsäulen wurde bei der Säulenchromatographie an diesem Adsorbens eine Mischung von Calciumphosphatgel und Zellulose verwendet.
In einer Saugflasche wurden 200 ml einer 10 %igen Suspension von Zellulose in Wasser gerührt. Während des Rührens wurden langsam 100 ml Calciumphosphatgelsuspension, 30 mg/ml, hinzugefügt. Nach beendeter Zugabe wurde die Suspension entlüftet und zum Gießen der Säule verwendet.
Diese Säule, 2 x 4 cm, wurde mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,7, 0,1 %ig an Renex 690 und an Natriumdesoxycholat, 1 mM EDTA und 0,1 mM DTE, äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurde weiter mit diesem Puffer gewaschen und zum Ablösen der Probe wurde die Phosphatkonzentration bis zu einer 0,15 M Konzentration gesteigert.
Bei anderen Fraktionierungen wurde eine Säule von 3 x 9 cm verwendet. Das Enzym wurde dabei in einem linearen Phosphatgradienten zwischen 0,01 und 0,15 M Phosphat abgelöst.

II.6.5. Fraktionierung an Hydroxylapatit

Hydroxylapatit wurde nach der Methode von Levin (63), wie in II.5.6.1. beschrieben, dargestellt.
Eine Hydroxylapatitsäule (3 x 12 cm) wurde mit 0,025 M Trispuffer, pH 7,7, 0,25 %ig an Renex 690, 10 %ig an Glycerin, 1 mM EDTA und 0,1 mM DTE, äquilibriert.
Die an DEAE vorgereinigten Reduktasefraktionen wurden direkt ohne vorherige Dialyse auf die Säule aufgetragen. Dann wurde zunächst mit Aquilibrierungspuffer, 0,32 M KCl, und anschließend mit 0,01 M Kaliumphophatpuffer, pH 7,7, 0,1 %ig an Renex 690, 10 %ig an Glycerin, 1 mM EDTA und 0,1 mM DTE, gewaschen. Die Phosphatkonzentration wurde in einem linearen Gradienten gesteigert und dabei die Reduktase eluiert.

II.6.6.1. Darstellung von ω-Aminooctyl-Sepharose 6B

Die Hydrophobisierung von Sepharose mit Octamethylendiamin wurde nach einer Vorschrift von Cuatrecasas (68) durchgeführt.
14,4, g Octamethylendiamin wurden in 60 ml 0,1 M $NaHCO_3$ gelöst und bis zum Gebrauch kalt aufbewahrt.
60 g mit Wasser gewaschener Sepharose 6B wurden im gleichen Volumen Wasser aufgenommen und mit 18 g Bromcyan versetzt. Während der Reaktion wurden Temperatur und pH-Wert konstant gehalten. Die Temperatur wurde durch Zugabe von zerstoßenem Eis auf 20°C eingestellt; der pH-Wert wurde laufend über eine pH-Elektrode kontrolliert und durch Eintropfen von 2 N NaOH auf pH 11 nachgestellt. Das Ende der Reaktion kann daran erkannt werden, daß keine Protonen mehr freigesetzt werden. Dann wurde eine größere Menge Eis zugesetzt, die Suspension schnell auf einen Büchnertrichter gegeben und mit 300 ml kalter 0,1 M $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Im Anschluß daran wurde die vorbereitete Hexamethylendiaminlösung möglichst rasch zugegeben, der Büchnertrichter kurz

geschwenkt, die Suspension in eine Flasche geschüttet und über Nacht im Kühlraum gerührt.

Nach ca. 16 stündigen Rühren wurde die ω-Aminooctyl-Sepharose wie folgt gewaschen:

2 l Wasser
200 ml 0,1 M $NaHCO_3$, 1 M an NaCl
2 l Wasser
200 ml Citratpuffer, pH 4,0
4 l Wasser
2 l 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0

In diesem Phosphatpuffer wurde die Sepharose im Kühlraum aufbewahrt.

II.6.6.2. Fraktionierung an ω-Aminooctyl-Sepharose 6B

Die an DEAE vorgereinigte Reduktasefraktion wurde über Nacht gegen 0,01 M Kaliumphposphatpuffer, pH 7,7, 0,1 %ig an Renex 690, 10 %ig an Glycerin, 1 mM EDTA und 0,1 mM DTE, dialysiert. Das Dialysat wurde dann auf eine Aminooctyl-Sepharosesäule (1,2 x 18 cm) aufgetragen. Diese Säule war vorher mit Dialysepuffer äquilibriert worden. Die Elution erfolgte in einem linearen KCl-Gradienten zwischen 0 und 0,6 M KCl in Dialysepuffer.

II.6.7. Fraktionierung an 2'5'-ADP-Sepharose 4B

Die durch Ionenaustauschchromatographie und Adsorptionschromatographie an Calciumphosphatgel oder Hydroxylapatit oder statt dessen durch hydrophobe Chromatographie an Aminooctyl-Sepharose angereicherte Reduktasefraktion wurde an dem Affinitätsgel weitergereinigt.
Die Fraktionierung wurde wie für die Reduktase aus der Rattenleber beschrieben, II.5.5. , durchgeführt.

II.6.8. Einengung der Reduktaselösung

War eine Einengung der Reduktaselosung notwendig, so wurde dies, wie in II.5.6.2. beschrieben, an Hydroxylapatit oder durch Ultrafiltration durchgeführt. Dazu wurde eine Amicon Ultrafiltrationszelle, Modell 12, und PM 30-Membranen benutzt.

II.6.9. Fraktionierung an Ultrogel ACA 34

Bei einigen Reduktasepräparationen waren nach der Affinitätschromatographie in der SDS-Gelelektrophorese noch weitere Banden schwach zu erkennen. Diese Verunreinigungen wurden durch eine Gelfiltration an Ultrogel ACA 34 entfernt.
Die Ultrogelsäule ( 1,5 x 100 cm) wurde mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 0,1% an Renex 690 und Natriumcholat, 10 %ig an Glycerin, 0,1 mM EDTA und DTE, sowie 0,1 M KCl, äquilibriert. Der gleiche Puffer wurde auch bei der Trennung benutzt.

II.6.10. Aufbewahrung des Enzyms

Die Reduktase wurde nach Überprüfung der Reinheit durch SDS-Gelelektrophorese nach der Affinitätschromatographie bzw. nach der Gelfiltration in dem jeweiligen Elutionspuffer bei -26°C eingefroren. Selbst nach mehrmonatiger Lagerung unter diesen Bedingungen konnten keine Enzymverluste beobachtet werden.

## II.7. Isolierung des Fremdstoffmonooxygenasesystems aus Scheineleber

### II.7.1. Solubilisierung des Monooxygenasesystems

Die in der Ultrazentrifuge sedimentierten Mikrosomen wurden in 0,01 M Tris-Acetat-Puffer, pH 7,4, 0,1 mM EDTA und 20 %ig an Glycerin,so aufgenommen, daß eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml eingestellt wurde.
In diese Mikrosomensuspension wurde unter Rühren eine 10 %ige Renexlösung eingetropft. Pro 100 ml Suspension wurden dabei 5 ml der Detergentienlösung eingesetzt, so daß ein Protein/Renex-Verhältnis von 1 : 1 eingestellt wurde. Nach beendeter Zugabe wurde noch 20 Minuten im Kühlraum gerührt, und dann wurden die solubilisierten Proteine von der Membranfraktion in einer einstündigen Zentrifugation bei 48.000 g abgetrennt. Das Sediment wurde verworfen, und der Überstand wurde weiter aufgearbeitet.
Bei Vorversuchen zur Solubilisierung war auch Natriumcholat als Detergens verwendet worden. Dieses wurde vor Gebrauch nach einer Vorschrift von Guengerich (70) gereinigt.
100 g Cholsäure wurden in 750 ml 50 %igem Äthanol durch Erhitzen gelöst. Dann wurden 0,5 g EDTA und 12,5 g Aktivkohle zugegeben und anschließend wurde die Lösung noch einige Minuten gekocht. In der Zwischenzeit wurde ein Büchnertrichter mit einem # 4 Whatman-Filter, auf den zusätzlich 10 g Celite im Vakuum gepackt wurden, vorbereitet. Über diesen Filter wurde die kochend heiße Lösung schnell gesaugt. Das Filtrat wurde in ein sauberes Gefäß überführt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Kristalle auf einem Filter gesammenlt und mit kaltem 50 %igem Äthanol gewaschen. Die gewaschenen Kristalle wurden dann noch einmal wie oben beschrieben umkristallisiert. Bei dieser zweiten Umkristallisation wurden EDTA und Aktivkohle nicht mehr benutzt.
Die gewonnenen Cholsäurekristalle wurden wiederum mit kaltem 50 %igem Äthanol gewaschen und danach getrocknet.

4 g NaOH wurden in 150 ml Wasser gelöst. Dazu wurden 40 g der gereinigten Cholsäure gegeben und darin langsam gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde schließlich mit Essigsäure auf pH 7,4 eingestellt, und das Volumen wurde durch Zugabe von Wasser auf ein Endvolumen von 200 ml gebracht.
Diese 20 %ige Cholat-Lösung wurde als Stammlösung verwendet.

II.7.2. Polyäthylenglykolfällungen

Die durch Zentrifugation abgetrennten solubilisierten Proteine wurden erneut mit Renex versetzt. Pro 100 ml Lösung wurden 5 ml 10 %ige Renex-lösung zugegeben. Dann wurde butyliertes Hydroxytoluol zugesetzt und damit eine 20 µM Konzentration eingestellt. Danach wurde die Lösung 0,1 M an KCl gemacht. Nachdem sich das Chlorid vollständig gelöst hatte, wurde PEG bis zu einer 6 %igen Konzentration zugefügt. Die ausgefällten Proteine wurden durch eine Zentrifugation, 15 Minuten 8000 g, abgetrennt und verworfen. Der Überstand wurde weiter mit PEG behandelt und auf eine 15 %ige Konzentration gebracht. Ausgefallene Proteine wurden wiederum abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde verworfen, und das Sediment, das die Enzyme des Monooxygenasesystems enthält, wurde bei -20°C eingefroren.

### II.7.3. Auftrennung des Monooxygenasesystems an DEAE-Sephadex A-50

Die tiefgefrorenen PEG-Sedimente wurden in 0,025 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,7, 20 %ig an Glycerin und 0,5 %ig an Renex 690, mit 0,1 mM EDTA und DTE, aufgenommen und auf eine DEAE-Sephadex A-50 -Säule aufgetragen. Diese Säule, 5 x 50 cm, war vorher mit dem gleichen Puffer äquilibriert worden, der auch zum Aufnehmen der PEG-Sedimente benutzt worden war. Mit diesem Äquilibrierungspuffer wurde dann nachgewaschen, bis die erste P450-Fraktion eluierte. Zur weiteren Elution wurde ein stufenförmiger KCl-Gradient benutzt. Dafür wurde zuerst Äquilibrierungspuffer mit 0,12 M KCl und danach mit 0,32 M KCl verwendet. In diesen beiden KCl-haltigen Puffern war der Detergentiengehalt vermindert, die Renexkonzentration betrug 0,25 %.

### II.8. Reinigung von P450 I

### II.8.1. Einengen von P450 I an Calciumphosphatgel

Die am Ionenaustauscher gewonnenen P450 I-Fraktionen wurden vereinigt und mit einem Überschuß Calciumphosphatgel versetzt. Nach 20-minütigem Rühren in der Kälte wurde das Gel abzentrifugiert, 10 Minuten 8.000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Calciumphosphatgel in 0,025 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,7, 20 %ig an Glycerin und 0,25 %ig an Renex 690, mit 0,1 mM EDTA und DTE sowie 0,32 M KCl, aufgenommen. Dann wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Dieser Waschgang wurde noch einmal in der gleichen Weise mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 10 %ig an Glycerin und 0,1 %ig an Renex 690, durchgeführt. Auch dieser Überstand wurde verworfen.
P450 wurde mit 0,3 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20 %ig an Glycerin und 0,1 %ig an Renex 690, mit 0,1 mM EDTA und DTE sowie mit 20 µM Anilin, 16 µM Cyclohexan und 10 µM Biphenyl, vom Adsorbens gelöst.

II.8.2.1. Darstellung von Anilin-Sepharose 4B

Anilin-Sepharose wurde nach der Methode von Cuatrecasas (71), wie bei Katagiri et al. (72) beschrieben, dargestellt. 500 ml Sepharose 4B wurden ausgiebig mit Wasser gewaschen und anschließend im gleichen Volumen Wasser suspendiert. Zu der Suspension wurde über einen Tropftrichter eine Lösung von Cyanbromid gegeben. Diese Lösung war frisch bereitet und enthielt in einem Volumen von 500 ml Wasser 50 g Cyanbromid. Die Tropfgeschwindigkeit wurde so eingestellt, daß die gesamte Lösung innerhalb einer Stunde zugesetzt wurde. Während der Zugabe wurde der pH-Wert durch Eintropfen von 4 N NaOH konstant bei pH 11 gehalten. Die Temperatur der Suspension betrug 20°C. Bei Erwärmung wurde zerstoßenes Eis zugesetzt.
Wenn der pH-Wert nach beendeter Zugabe konstant blieb, wurde die aktivierte Sepharose auf einen Büchnertrichter gegeben und mit 10 l 100 mM $NaHCO_3$, pH 9,0, gewaschen. In 500 ml dieser Lösung wurde das Gel dann suspendiert.
Der Suspension wurden 46 ml Anilin zugesetzt und anschließend wurde über Nacht im Kühlraum gerührt. Das zugegebene Anilin war vorher durch zweifache Vakuumdestillation über Vigreux-Kolonnen vorgereinigt worden. Es wurde freundlicherweise von Herrn Dr. W. Haas zur Verfügung gestellt.
Am nächsten Tag wurde die Anilin-Sepharose wie folgt gewaschen:

2 l Äthanol/Wasser (1/1)
10 l Wasser
2 l 0,1 M $NaHCO_3$, 1 M an NaCl
4 l Wasser
2 l Citratpuffer, pH 4,0
4 l Wasser
4 l 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0,

In dem zuletzt gebrauchten Phosphatpuffer wurde die Anilin-Sepharose suspendiert und im Kühlraum aufbewahrt.

II.8.2.2. 1. Fraktionierung an Anilin-Sepharose

Eine Anilin-Sepharose-Säule, 12 x 3 cm, wurde mit 0,3 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20 %ig an Glycerin, mit 0,1 mM EDTA und DTE, sowie 20 µM Anilin, 16 µM Cyclohexan und 10 µM Biphenyl, äquilibriert. Im gleichen Puffer wurde P450 I auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde dann mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen. Die Phosphatkonzentration im Puffer wurde auf 0,15 M gesenkt und das Waschen damit fortgesetzt. P450 wurde anschließend in einem linearem Gradienten von der hydrophobisierten Sepharose gelöst. Beim Gradienten wurde die Phosphatkonzentration von 0,15 M auf 0,1 M gesenkt. Gleichzeitig dazu wurde der Detergentiengehalt linear auf 0,25 % an Renex und Natriumcholat angehoben.

Zu Beginn dieses Gradienten eluiert das Cytochrom. Die Fraktionen, bei denen $E_{416}$ größer als 0,1 war, wurden vereinigt und zur weiteren Reinigung verwendet.

II.8.2.3. 2. Fraktionierung an Anilin-Sepharose

Zu den an Anilin-Sepharose gewonnenen vereinigten Fraktionen wurde das gleiche Volumen 2 M $(NH_4)_2SO_4$-Lösung gegeben. Der pH-Wert dieser Lösung war vor der Zugabe mit 2 M Ammoniak auf pH 7,4 eingestellt worden.
Die verdünnte P450-Lösung wurde auf eine zweite Anilin-Sepharose-Säule, 10 x 1 cm, aufgetragen. Diese Säule war zuvor mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20 %ig an Glycerin und je 0,25 %ig an Renex 690 und Natriumcholat, mit 0,1 mM EDTA und DTE, 1 M $(NH_4)_2SO_4$, sowie 20 µM Anilin, 16 µM Cyclohexan und 10 µM Biphenyl, äquilibriert worden. Das gebundene Protein wurde anschließend in einem linearem Gradienten abgelöst. Beim Gradienten wurde die Phosphatkonzentration von 0,1 M auf 0,01 M erniedrigt und gleichzeitig die Ammonsulfatkonzentration von 1 M bis auf 0 M gesenkt.

### II.8.3. Fraktionierung an Hydroxylapatit

Die an Anilin-Sepharose abgetrennte P450 Ib-Fraktion wurde über Nacht gegen 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20 %ig an Glycerin und 0,1 %ig an Renex 690, mit 0,1 mM EDTA und DTE, sowie 20 µM Anilin, 16 µM Cyclohexan und 10 µM Biphenyl, dialysiert.
Das Dialysat wurde auf eine Hydroxylapatitsäule, 1 x 12 cm, aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit Dialysepuffer gewaschen. Dann wurde die Phosphatkonzentration auf 0,025 M erhöht und schließlich wurde P-450 mit 0,15 M Phosphatpuffer vom Adsorbens gelöst. In dem 0,025 M und 0,15 M Puffern waren keine Zusätze von Anilin, Cyclohexan und Biphenyl mehr enthalten.

### II.8.4. Absenkung der Renexkonzentration an Sephadex LH-20

Die Peakfraktionen der Hydroxylapatitsäule wurden vereinigt und, wie bei Ryan et al. (74) beschrieben, über eine Sephadex LH-20-Säule gegeben. Diese Säule, 3 x 30 cm, wurde mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,7, 50 %ig an Glycerin, äquilibriert. Dieser Puffer wurde nach der Probenaufgabe auch zur Elution des Cytochroms benutzt.

### II.8.5. Aufbewahrung von P450 Ib

P450 Ib wurde in dem Puffer, in dem es an Sephadex LH-20 eluierte, eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

## II.9. Reinigung von P450 III

### II.9.1. Einengen von P450 III an Calciumphosphatgel

Die Proteinfraktion, die bei einer 0,12 M KCl-Konzentration von der DEAE eluierte, wurde mit Hilfe von Calciumphosphatgel eingeengt.
Zu der Proteinlösung wurde ein Überschuß von Calciumphosphatgel gegeben. Nach 20-minütigem Rühren wurde das Gel in einer 10-minütigen Zentrifugation bei 8.000 g abzentrifugiert.
Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 0,15 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20 %ig an Glycerin und 0,1 %ig an Renex 690, mit 0,1 mM EDTA und DTE, 20 µM Anilin, 16 µM Cyclohexan und 10 µM Biphenyl, aufgenommen. Dann wurde wiederum abzentrifugiert und das Gel anschließend noch einmal mit dem Phosphatpuffer behandelt.
Die beiden Überstände wurden vereinigt und fünf Stunden lang gegen einen gleich zusammengesetzten Puffer, der jedoch nur 0,01 M an Phosphat war, dialysiert.

### II.9.2. Abtrennung von Cytochrom $b_5$ an Anilin-Sepharose

Das Dialysat wurde auf eine Anilin-Sepharose-Säule, 3 x 25 cm, aufgetragen. Diese Säule war zuvor mit dem Dialysepuffer äquilibriert worden.
Nach dem Auftragen des Dialysats wurde zunächst mit Dialysepuffer nachgewaschen, bis kein Protein mehr eluiert wurde. Dann wurde die Phosphatkonzentration auf 0,001 M gesenkt und gleichzeitig die Detergentienkonzentration erhöht auf je 0,2 %ig an Renex und Cholat. Unter diesen Bedingungen werden P-450 und die $b_5$-Reduktase von der hydrophobisierten Sepharose abgelöst.

Wenn kein P450 und keine Reduktase mehr eluierte, wurde noch einmal kurz mit Dialysepuffer gewaschen, bevor $b_5$ durch einen linearen KCl-Gradienten von 0 bis 1 M KCl abgelöst wurde.

II.9.3. Abtrennung der $b_5$-Reduktase an Hydroxylapatit

P450 III und die $b_5$-Reduktase wurden an Anilin-Sepharose in einer Proteinfraktion gewonnen. Diese wurde möglichst umgehend auf eine Hydroxylapatit-Säule aufgetragen.
Die Säule, 3 x 15 cm, war vorher mit dem Elutionspuffer der Anilin-Sepharose-Säule äquilibriert worden. Nach beendeter Probenaufgabe wurde die Phosphatkonzentration in einem linearen Gradienten auf 0,06 M erhöht. Dabei eluiert die $b_5$-Reduktase. P450 III bleibt dabei gebunden und wird nach Erhöhen der Phosphatkonzentration auf 0,15 M eluiert.

II.9.4.1. Darstellung von Laurat-Sepharose

Laurat wurde über Hexamethylendiamin als "Spacer" an Sepharose 4B gekoppelt.
Die Darstellung von ω-Aminohexyl-Sepharose 4B erfolgte wie in Abschnitt II.6.6.1. für das Aminooctylderivat beschrieben. Dabei wurden 60 g Sepharose mit 13,8 g Hexamethylendiamin und 18 g Bromcyan umgesetzt.
Der Erfolg der Kopplung wurde durch den Farbtest nach Inman und Dintzis (79), der auf einem Nachweis freier Aminogruppen beruht, überprüft.
Dazu wurde 1 ml einer gesättigten Natriumboratlösung zu einer Probe von 0,5 ml substituierter Sepharose gegeben. Dann wurden 3 Tropfen einer 3 %igen Lösung von Natrium-2,4,6-trinitrobenzolsulfonat zugetropft. Nach zweistündigem Stehenlassen läßt sich die Anwesenheit von freien Aminogruppen durch eine intensive Orangefärbung der Agarose erkennen.

Die Kopplung von Laurat an die ω-Aminohexyl-Sepharose wurde nach der Methode von Cuatrecasas (71) mit Carbodiimid, wie bei Gibson und Schenkman (59) beschrieben, vorgenommen. 10 g ω-Aminohexyl-Sepharose 4B wurden auf einer Nutsche zuerst mit 1 l 0,5 M NaCl und dann mit 250 ml dest. Wasser, pH 4,5, gewaschen. Die feuchte Sepharose wurde anschließend in einem DMF/Wasser-Gemisch (1/1) aufgenommen. Zu der Suspensuion wurden 800 mg Laurinsäure, gelöst in 10 ml DMF, und 2,2 g 1-Äthyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid in 10 ml dest. Wasser gegeben. Die Suspension wurde eine Stunde lang mehrfach mit einem Glasstab gerührt und dann über Nacht stehen gelassen.
Am nächsten Morgen wurde das Gel wie folgt gewaschen:

500 ml DMF
2 l DMF/Wasser 1/1
2 l Wasser
200 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer,pH 7,4, 25 %ig an Glycerin

In diesem Puffer wurde die substituierte Sepharose im Kühlraum aufbewahrt.

II.9.4.2. Fraktionierung an Laurat-Sepharose

Die Peakfraktionen der Hydroxylapatitsäule wurden vereinigt und auf eine Laurat-Sepharose-Säule aufgetragen.
Diese Säule, 1,2 x 15 cm, war zuvor mit folgendem Puffer äquilibriert worden: 0,15 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 10 %ig an Glycerin und 0,1 %ig an Renex 690, 0,1 mM EDTA und DTE, 20 µM Anilin, 16 µM Cyclohexan und 10 µM Biphenyl.
Nach beendeter Probenaufgabe wurde die Säule mit dem gleichen Puffer weitergewaschen, ehe ein Gradient angelegt wurde, bei dem die Phosphatkonzentration linear auf 0,01 M erniedrigt und die Renexkonzentratation linear auf 1 %ig erhöht wurde.
Im Verlaufe dieses Gradienten wurde P450 III eluiert.
Nach Ablauf des Gradienten verbleibt eine intensiv rot gefärbte Bande auf der Säule. Diese Bande wird von $b_5$ gebildet, das durch Zugabe von 1 M KCl in Gegenwart von 1 % Renex vom Gel abgelöst wurde.

II.9.5. Absenkung der Renexkonzentration an Sephadex LH-20

Zum Abschluß der Präparation wurde der Renexgehalt der P450-Lösung an Sephadex LH-20, wie bei Ryan et al. (74) beschrieben, abgesenkt.
Eine Sephadex LH-20-Säule, 3 x 30 cm, wurde mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,7, 50 %ig an Glycerin, äquilibriert. Mit dem gleichen Puffer wurde P450 III dann nach dem Auftragen eluiert.

II.9.6. Aufbewahrung von P450 III

P450 III wurde in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,7, 50 %ig an Glycerin, bei -20°C eingefroren.

## II.10. Reinigung von Cytochrom $b_5$

### II.10.1. Fraktionierung an DEAE-Sepharose Cl-6B

Die an Anilin-Sepharose von P450 III abgetrennte Fraktion von Cytochrom $b_5$ wurde über Nacht gegen 5 l 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,1, mit 0,1 mM EDTA und 2 %ig an Triton X-100, dialysiert.
Das Dialysat wurde auf eine Säule, 3 x 60 cm, von DEAE-Sepharose Cl-6B gegeben, die vorher mit dem benutzten Dialysepuffer äquilibriert worden war. Die Elution des Cytochroms erfolgte über einen linearen KCl-Gradienten zwischen 0 und 0,3 M KCl in Dialysepuffer.

### II.10.2. Fraktionierung an Sephacryl S 200 Superfine

Die $b_5$-Peakfraktionen des Ionenaustauschers wurden vereinigt und in einer Amicon-Ultrafiltrationszelle über PM-10 Membranen bis auf ein Volumen von 10 ml eingeengt.
Die eingeengte $b_5$-Lösung wurde durch eine Gelfiltration an Sephacryl S 200 Superfine weitergereinigt. Die verwendete Säule, 1,5 x 100 cm, war vorher mit 20 mM Tris-Acetat-Puffer, 0,2 mM EDTA und 1,0 %ig an Desoxycholat, äquilibriert. Der gleiche Puffer wurde bei der Trennung weiterbenutzt.

### II.10.3. Aufbewahrung von Cytochrom $b_5$

Die Peakfraktionen der Gelfiltration wurden vereinigt und bei -20°C eingefroren. Bei dieser Aufbewahrung waren innerhalb mehrerer Monate keine Verluste festzustellen.

## II.11. Reinigung der $b_5$-Reduktase

Die $b_5$-Reduktase wurde von P450 III an Hydroxylapatit abgetrennt. Die weitere Isolierung erfolgte durch Affinitätschromatographie und Gelfiltration.

### II.11.1. Fraktionierung an Blue Sepharose CL-6B

Eine Säule, 20 x 1,5 cm, mit Blue Sepharose CL-6B wurde mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,25, 10 %ig an Glycerin und 0,1 %ig an Renex 690, äquilibriert.
Die an Hydroxylapatit abgetrennte Reduktasefraktion wurde ohne weitere Vorbehandlung direkt auf die vorbereitete Affinitätssäule aufgetragen. Dann wurde zunächst mit Äquilibrierungspuffer gewaschen, bevor die Reduktase durch einen linearen KCl-Gradienten von 0 bis 0,5 M KCl abgelöst wurde.

### II.11.2. Fraktionierung an Sephacryl S 200 Superfine

Die Reduktasefraktion wurde in einer Amicon-Ultrafiltrationszelle über einer PM 30 Membran eingeengt und anschließend gegen 3 l 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, 0,5 %ig an Triton X-100 und mit 1 mM EDTA, dialysiert.
Mit dem gleichen Puffer wurde eine Säule von Sephacryl S 200 Superfine, 1,5 x 100 cm, äquilibriert. Auf diese Säule wurde die eingeengte Reduktaselösung aufgetragen und mit dem benutztem Äquilibrierungspuffer anschließend wieder eluiert.

### II.11.3. Aufbewahrung der $b_5$-Reduktase

Die bei der Gelfiltration gewonnenen reduktasehaltigen Fraktionen wurden einzeln bei -20°C in der Tiefkühltruhe eingefroren. Unter diesen Lagerungsbedingungen treten keine merklichen Enzymverluste auf. Mehrfaches Auftauen und Wiedereinfrieren hingen führt zur vollständigen Denaturierung des Enzyms.

II.12. SDS-Gelelektrophoresen

Zur Überprüfung der elektrophoretischen Reinheit der isolierten Proteine wurden SDS-Gelelektrophoresen nach der Methode von Weber und Osborn (81) durchgeführt.

30 bis 50 µl Enzymlösung mit einem Proteingehalt von 0,8 bis 1 mg/ml wurden mit 0,1 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, 1 %ig an SDS und 2-Mercaptoäthanol, versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurden je 5 µl 0,05 %iges Bromphenolblau und 2-Mercaptoäthanol sowie ein Tropfen Glycerin zugegeben. Die Proben wurden auf 10 %ige Polyacrylamidgele ( 5 x 100 mm) aufgetragen und mit 0,1 %iger SDS-Lösung überschichtet. Die Elektrophorese wurde mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, 0,1 %ig an SDS, als Elektrophoresepuffer, bei einer Stromstärke von 8 mA pro Gelröhrchen durchgeführt.
Kurz bevor die Bromphenolblaubanden bis zum Gelende gewandert waren, wurde die Elektrophorese abgestoppt. Die Gele wurden aus den Röhrchen gepresst und eine Stunde lang in Coomassie-Brillantblaulösung, 1,25 g in 450 ml Methanol + 50 ml Eisessig, bei 50°C gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in einer mit 7,5 % igen Essigsäure gefüllten Entfärbekammer bei einer Stromstärke von 200 mA oder mit einem Gemisch von Methanol/Eisessig/Wasser (320/80/500) als Entfärbelösung.

## III. Ergebnisse

In dieser Arbeit soll eine Methodik zur Isolierung von P450 und $b_5$ sowie der beiden zugehörigen Reduktasen erarbeitet werden. Wenn möglich,sollen die vier Enzyme aus einem Ausgangsmaterial gewonnen werden. Eine solche Isolierung aller Komponenten des mikrosomalen Monooxygenasesystems ist bisher noch nicht durchgeführt worden.
Als Einstieg in diese aufwendige Aufarbeitung wurde dabei die Reinigung der P450-Reduktase gewählt, denn für dieses Enzym waren mehrere bewährte Reinigungsverfahren bekannt (44,45). Bei den dazu erforderlichen Fraktionierungsschritten sollte das chromatographische Verhalten der übrigen Enzyme des Systems mitbeobachtet werden, um Rückschlüsse auf deren weitere Isolierung ziehen zu können.

### III.1. Isolierung von P450-Reduktase aus Rattenleber

Die P450-Reduktase wurde aus Rattenleber in Anlehnung an die Arbeiten von Dignam und Strobel (43,45) sowie Yasukochi und Masters (44) isoliert.
Das Enzym erwies sich nach einer 615fachen Anreicherung in der SDS-Gelelektrophorese als rein. Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms mit DCPIP als Elektronenakzeptor beträgt 43,01 AE/mg Protein.

Ausgangsmaterial für die Isolierung waren die Lebern von 10 mit Phenobarbital vorbehandelten weiblichen Ratten.
Das Gesamtgewicht der perfundierten Lebern betrug 73,6 g. Daraus wurden 1425 mg mikrosomales Protein gewonnen, was einer Ausbeute von 36,2 %, bezogen auf das Homogenat, entspricht. Zur Ausbeutebestimmung wurde der P450-Gehalt in Homogenat und Mikrosomen herangezogen.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die in der Mikrosomenfraktion bestimmten Reduktaseaktivitäten und Cytochromkonzentrationen.

| Protein Reduktasen Cytochrome | Mikrosomenfraktion | | sol. Mikrosomen nach Protaminsulfatbehandlung | |
|---|---|---|---|---|
| | nMol AE / mg | nMol AE / mg | nMol AE / mg | nMol AE / mg |
| Protein | 1425 | - | 1374 | - |
| P450 | 943 | 0,66 | 844 | 0,61 |
| $b_5$ | 336 | 0,23 | 269 | 0,19 |
| P450-Redukt. | 101 | 0,07 | 101 | 0,07 |
| $b_5$-Reduktase | 265 | 0,18 | 215 | 0,15 |

Tab. 1

Bestimmung von Enzymen des Monooxygenasesystems in der Mikrosomenfraktion vor und nach der Solubilisierung

In die Tabelle sind die entsprechenden Werte für die solubilisierte Fraktion mit aufgenommen. Die P450-Reduktase wird bei der Solubilisierung vollständig aus der Membran gelöst. Verbunden damit ist eine geringfügige Anreicherung, die sich bei der spezifischen Aktivität aber erst in der dritten Stelle hinter dem Komma bemerkbar macht. Bei den anderen drei bestimmten Enzymen nimmt die spezifische Aktivität hingegen ab. Da aber annähernd das gesamte mikrosomale Protein solubilisiert wird, beruht die Abnahme der spezifischen Aktivität bzw. Konzentration bei der $b_5$-Reduktase und den beiden Cytochromen zumindest teilweise auf Denaturierungsvorgängen.

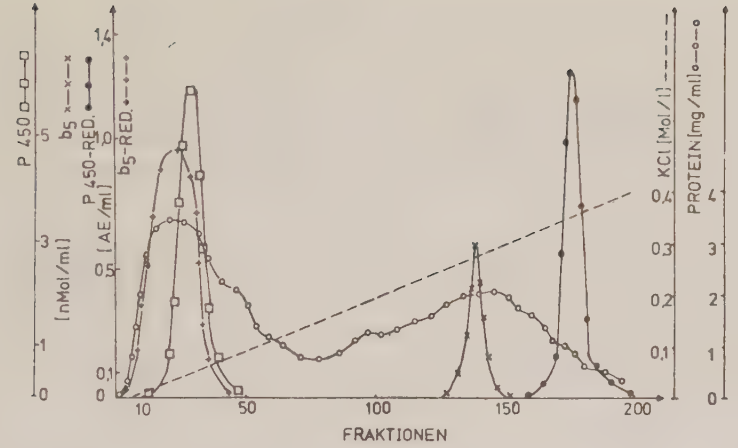



Abb. 4

Auftrennung der solubilisierten und mit Protaminsulfat behandelten Rattenlebermikrosomen an DEAE Sephadex A-25.

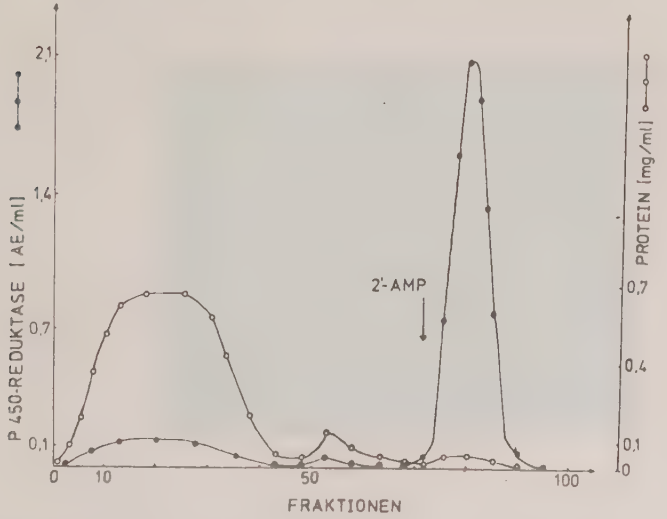



Abb. 5

Fraktionierung der an DEAE Sephadex A-25 vorgereinigten P450-Reduktasefraktion an 2'5'-ADP-Sepharose

Am DEAE-Ionenaustauscher wird die Reduktase von den anderen Enzymen des mikrosomalen Monooxygenasesystems abgetrennt. Gleich zu Beginn des Gradienten eluieren P450 und die $b_5$-Reduktase, während $b_5$ und die P450-Reduktase fester am Austauscher gebunden werden und erst bei einer 0,25 M bzw. einer 0,35 M KCl-Konzentration von der DEAE abgelöst werden.
In der nachfolgenden Affinitätschromatographie wird die Reduktase bis zur elektrophoretischen Reinheit angereichert. Die Peakfraktionen enthielten in einem Volumen von 18 ml 0,72 mg Protein und 31 Enzymeinheiten.
Wegen der geringen Proteinkonzentration von 0,04 mg/ml erwies es sich als nötig, eine Einengung durchzuführen. Dabei wurde das Enzym an Hydroxylapatit gebunden, mit Puffer gewaschen und schließlich mit einem 0,3 M Phosphatpuffer abgelöst. Diese Methode hat den Vorteil, daß neben der Einengung auch noch eine Abtrennung von 2'-AMP, das zur Elution des Enzyms von der Affinitätssäule gebraucht wird, erfolgt.

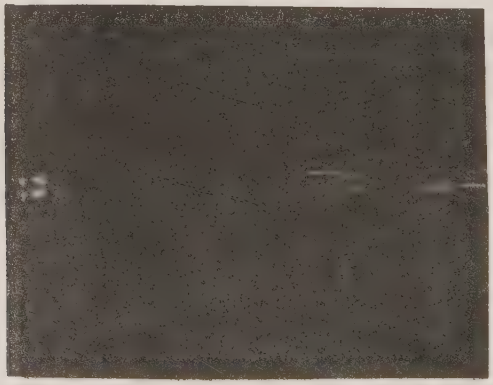


Abb. 6
SDS-Gelelektrophorese der P450-Reduktase aus Rattenleber

| Reinigungsschritt | Gesamt-aktivität (AE) | Gesamt-protein (mg) | spezifische Aktivität (AE/mg) | Anrei-cherung | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Mikrosomen | 101 | 1425 | 0,07 | - | 100 |
| solubilisierte Mikrosom. nach Protaminsulfat-behandlung | 101 | 1374 | 0,07 | - | 100 |
| DEAE-Sephadex A-25 | 58 | 67,7 | 0,85 | 12,2 | 57,4 |
| 2'5'-ADP-Sepharose | 31 | 0,72 | 43,05 | 615,1 | 30,7 |

Tab. 2
Reinigung der P450-Reduktase aus Rattenleber

Bei der Reinigung wurden aus den Lebern von 10 mit Phenobarbital induzierten Ratten 0,72 mg P450-Reduktase gewonnen. Die dabei erzielte Ausbeute von 30,7 % kann als gut bezeichnet werden und kann sicherlich nicht mehr wesentlich gesteigert werden.
Im Hinblick auf das Endziel der Arbeit, die Rekonstitution des mikrosomalen Monooxygenasesystems aus den gereinigten Proteinen, ist die isolierte Enzymmenge gering. Selbst eine Verdopplung oder eine Verdreifachung des Ansatzes würde daran nichts ändern, während Arbeitsaufwand und Kosten gleichzeitig unverhältnismäßig anstiegen.
Daher wurde als Ausgangsmaterial für die weitere Isolierung Schweineleber gewählt, die billig und in großen Mengen bezogen werden kann,

## III.2. Isolierung der P450-Reduktase aus Schweineleber

### III.2.1. Mikrosomenpräparation

Die bei der Rattenleber angewendete Mikrosomenpräparation konnte nicht direkt auf die Schweineleber übertragen werden. Es erwies sich als nötig, die Mikrosomen mit Calcium auszufällen, um eine Volumeneinengung zu erreichen, da pro UZ-Lauf maximal 340 ml zentrifugiert werden konnten.
Die Mikrosomenausbeute bei der Schweineleberaufarbeitung liegt in der gleichen Größenordnung wie bei der Rattenleber. Tabelle 3 gibt einen Überblick.

| Homogenat | Überstand 13.200 g | $Ca^{++}$-Sediment | UZ-Sediment |
|---|---|---|---|
| 100 | 63,7 ± 6,3 (n = 5) | 62,8 ± 6,2 (n = 5) | 35,2 ± 18,6 (n = 5) |

Tab. 3
Mikrosomenausbeuten gemessen über den P450-Gehalt.
Die Werte sind prozentual angegeben bezogen auf die P450-Menge im Homogenat, die gleich 100 % gesetzt wurde.

Die bei der Homogenisierung freigesetzten mikrosomalen Partikel lassen sich vollständig in Gegenwart von 8 mM $Ca^{++}$ ausfällen. Während die Werte für die beiden ersten Fraktionen der Leberaufarbeitung, Überstand bei 13.200 g und $Ca^{++}$-Sediment, gut übereinstimmen, streuen die Ausbeuten in der letzten Fraktion, die aus den in der Ultrazentrifuge bei 105.000 g sedimentierten Mikrosomen besteht, erheblich. Deutlich ist aber ein starker Verlust von P450 bei diesem Schritt.

| P450 (nMol/mg) | $b_5$ (nMol/mg) | P450-Redukt. (AE/mg) | $b_5$-Reduktase (AE/mg) |
|---|---|---|---|
| 0,55 ± 0,28 (n = 20) | 0,43 ± 0,13 (n = 20) | 0,086 ± 0,033 ( n = 20) | 3,40 ± 1,04 (n = 5) |

Tab. 4

Bestimmung von P450, $b_5$ und der beiden zugehörigen Reduktasen in der Mikrosomenfraktion. Die angegebenen Werte sind bezogen auf mg mikrosomales Protein.

Wie die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen, schwanken die spezifischen Cytochromkonzentrationen und Reduktaseaktivitäten in verschiedenen Mikrosomenfraktionen sehr stark.
Am deutlichsten drückt sich dies beim P450 aus. Hier beträgt die Standardabweichung, prozentual ausgedrückt, 50,9 %.
Die höchsten gefundenen Werte lagen dabei bei 0,99 und die niedrigsten bei 0,22 nMol P450 pro mg mikrosomalen Proteins.
Diese starken Schwankungen beruhen im wesentlichen auf der biologischen Streuung. Es wurden sowohl Lebern von weiblichen als auch von kastrierten männlichen Schweinen aufgearbeitet und auf die Vorbehandlung, wie z.B. Futter, bestand keinerlei Einflußmöglichkeit. Daneben ist auch noch die Instabilität von P450 zu berücksichtigen. Das Cytochrom ist ein sehr empfindliches Protein, das leicht denaturiert. Verzögerungen oder Fehler bei der Mikrosomenpräparation verursachen daher ein Absinken der P450-Konzentration.

III.2.2. Solubilisierung der P450-Reduktase

Zum Ablösen der Reduktase aus der Membranfraktion wurden verschiedene Verfahren erprobt. Die Ergebnisse dieser Solubilisierungen sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

| Solubilisierung | P450-Reduktase (%) | Protein (%) |
|---|---|---|
| mit Renex 690 (Renex/Protein =1,4) | 111,7 ± 10,2 (n = 4) | 82,4 ± 19,5 ( n = 4) |
| mit Renex 690 (Renex/Protein = 2) +Ultraschall | 118,4 ± 8,7 (n = 4) | 87,6 ± 10,4 (n = 4) |
| mit Renex 690 und Desoxycholat (Renex/Protein = 0,8) (Desoxych./Protein = 0,4) | 119,2 ± 14,1 (n = 5) | 89,9 ± 9,3 (n = 5) |

Tab. 5

**Ausbeuten an P450-Reduktase und mikrosomalem Protein bei verschiedenen Solubilisierungen. Die Protein- und Reduktasemenge in der Mikrosomenfraktion wurden gleich 100 % gesetzt und die entsprechenden Werte in der solubilisierten Fraktion wurden darauf bezogen in Prozent angegeben.**

Bei allen drei Verfahren wurde nach der Solubilisierung jeweils eine höhere Reduktaseaktivität gefunden als vorher in der Mikrosomenfraktion. Dies beruht vermutlich darauf, daß offenbar nicht die gesamte in der Membran vorhandene Reduktase für das Substrat DCPIP zugänglich ist. Denkbar ist auch ein aktivierender Effekt der Detergentien auf die P450-Reduktase.

Die von der Rattenlebermikrosomenaufarbeitung übernommene Solubilisierung ergibt die niedrigste Ausbeute an Reduktase. Diese Ausbeute kann durch Ultrabeschallung und Erhöhen

der Renexkonzentration noch gesteigert werden.
Auf einen gleich hohen Wert kommt man bei der Solubilisierung nach Yasukochi und Masters (44) mit Renex und Desoxycholat. Bei allen drei Solubilisierungen wird die P450-Reduktase angereichert. Diese Anreicherung der Reduktase ist mit einem Faktor von 1,3 in allen drei Fällen gleich hoch.

III.2.3. Reinigung der P450-Reduktase

Es wurde zunächst versucht, die Präparation der Reduktase aus der Rattenleber auf das homologe Enzym aus der Schweineleber zu übertragen. Dabei traten schon bei der Ionenaustauschchromatographie Schwierigkeiten auf, denn das Enzym erwies sich bei hohen Ionenstärken als recht instabil. Abbildung 7 zeigt das Elutionsdiagramm eines solchen Trennungsganges an DEAE-Sephadex A-50.

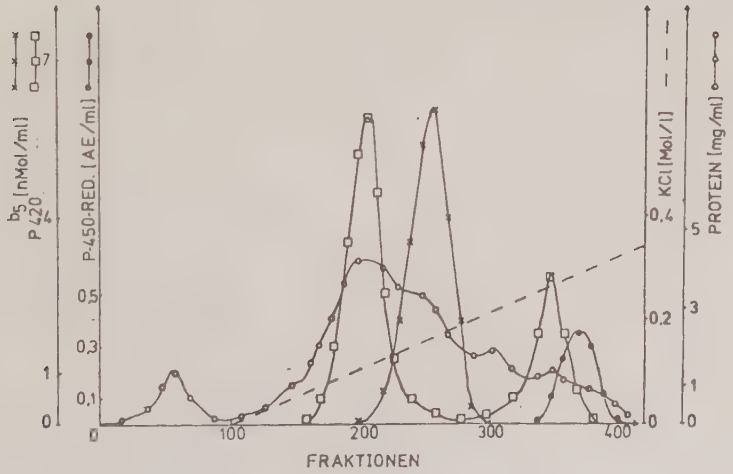



Abb. 7

Auftrennung der mit Renex und Desoxycholat solubilisierten Mikrosomen an DEAE-Sephadex A-50. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen linearen KCl-Gradienten.

Die Mikrosomenfraktion, deren Auftrennung durch Ionenaustauschchromatographie in Abbildung 7 dargestellt ist, war vorher nach der Methode von Yasukochi und Masters (44) mit Renex und Desoxycholat solubilisiert worden. Die Elution erfolgte wie bei der Rattenleberreduktase durch einen linearen KCl-Gradienten. Dabei wurden große Enzymverluste festgestellt, denn die Ausbeuten bei diesem Schritt lagen nicht höher als 10 %. Geringfügige Ausbeutesteigerungen können dadurch erreicht werden, daß den Elutionslösungen FMN in einer 2 µM Konzentration zugesetzt wird.
Die Enzymverluste beruhen nicht auf einer veränderten Solubilisierung, denn sie treten auch bei den anderen Solubilisierungen immer dann auf, wenn die am Ionenaustauscher gebundene P450-Reduktase während eines KCl-Gradienten längere Zeit bei hohen Ionenstärken vorliegt.
Bei stufenförmiger Elution mit steilen Gradienten hingegen werden Ausbeuten über 50 % erzielt. Ein Elutionsdiagramm dazu ist in Abbildung 8 dargestellt.

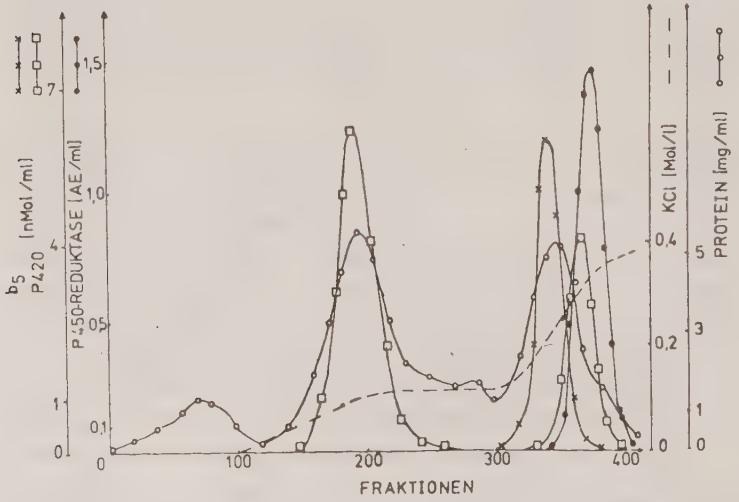



Abb. 8

Auftrennung von mit Renex und Desoxycholat solubilisierten Mikrosomen an DEAE-Sephadex A-50. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen stufenförmigen KCl-Gradienten

Wie bei der Isolierung der P450-Reduktase aus der Rattenleber wurden auch hier die anderen Enzyme des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenasesystems, P450, $b_5$ und $b_5$-Reduktase, mitbeobachtet, um für deren Isolierung Anhaltspunkte zu finden.
Als wesentlicher Unterschied zum chromatographischen Verhalten der Rattenleberenzyme, Abbildung 4, fällt bei den Enzymen aus der Schweineleber, Abbildung 7 und 8, ins Auge, daß Cytochrom P450, das hier allerdings auf Grund der Solubilisierung mit Desoxycholat als P420 vorliegt, vom DEAE-Ionenaustauscher in zwei deutlich getrennten Fraktionen eluiert. Die erste wird bei einer 0,11 M und die zweite bei einer 0,27 M KCl-Konzentration vom Ionenaustauscher gelöst. Rechromatographiert man die beiden P420-Fraktionen getrennt voneinander noch einmal an DEAE-Sephadex A-50, dann erhält man jeweils nur einen Peak und beobachtet keine nochmalige Auftrennung.
Die bei höheren Ionenstärken eluierende P450-Fraktion wird bei der Chromatographie, auch bei einem flachen Gradienten, nur unvollständig von der P450-Reduktase getrennt. Cytochrom $b_5$ eluiert zwischen den beiden P420-Peaks.

Da, bedingt durch die Instabilität der Reduktase, steile stufenförmige KCl-Gradienten erforderlich waren, sind $b_5$, die zweite P420-Fraktion und die P450-Reduktase dann in einem einzigen Proteinpeak zusammengedrängt.

Im Durchlauf der Säule erscheinen stark getrübte lipidhaltige Fraktionen. Bei einigen Präparationen konnten in diesen auch geringe Mengen an P420 nachgewiesen werden.

Neben der säulenchromatographischen Durchführung wurde die Fraktionierung am Ionenaustauscher auch nach der Vorschrift von Yasukochi und Masters (44) im "batch"-Verfahren versucht. In einem Vorversuch dazu wurde geklärt, wieviel Gel pro Gramm mikrosomalen Proteins nötig war, um die Reduktase möglichst vollständig zu binden. Daher wurde zu einer Lösung von solubilisierten Mikrosomen schrittweise DEAE-Sephadex gegeben und nach 15-minütigem Rühren wurde der

Überstand vom Ionenaustauscher und dem daran gebundenen Protein auf der Nutsche abgetrennt. Im Überstand wurde dann die verbliebene Reduktaseaktivität gemessen,und dieser wurde erneut mit einer Menge Ionenaustauscher verrührt. Dies wurde so lange wiederholt, bis die Reduktaseaktivität im Überstand konstant blieb.
Die dabei verwendete solubilisierte Mikrosomenfraktion enthielt in einem Volumen von 626 ml 6.532 mg Protein. Die spezifische Aktivität der Reduktase betrug 1,08 AE/mg. Nach fraktionierter Zugabe von insgesamt 1.500 ml Gelbett verblieb im Überstand noch eine Restaktivität von 18 % bezogen auf die Ausgangsmenge. Weitere Zugabe von Ionenaustauscher verursachte nur noch eine geringfügige Abnahme der Aktivität. In den nachfolgenden Fraktionierungen im "batch"-Verfahren wurde daher jeweils pro mg Protein ein Gelbettvolumen von 250 ml DEAE-Sephadex A-50 eingesetzt.

| Fraktion | Volumen (ml) | Protein (mg) | Aktivität (AE) | spez.Aktivität (AE/mg) | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| sol.Mikros. | 724 | 6588 | 547 | 0,083 | 100 |
| Eluat ohne KCl | 3850 | 3136 | 64 | 0,020 | 11,7 |
| Eluat mit 0,15 M KCl | 4230 | 2173 | 122 | 0,056 | 22,4 |
| 1.Eluat mit 0,4 M KCl | 325 | 910 | 43 | 0,047 | 4,2 |
| 2.Eluat mit 0,4 M KCl | 2784 | 686 | 284 | 0,425 | 52,1 |

Tab. 6
Fraktionierung von mit Renex solubilisierten Mikrosomen an DEAE-Sephadex im batch-Verfahren.

Das "batch"-Verfahren ermöglicht eine schnelle Arbeitsweise. Bei Ausbeuten um 50 % werden Anreicherungsfaktoren zwischen 3 und 5 erziehlt. In Tabelle 6 ist das beste von insgesamt 4 Ergebnissen gezeigt.
Die Säulenchromatographie wurde vorgezogen, weil sie neben höheren Ausbeuten auch bessere Anreicherungen liefert. Insbesondere die Verunreinigungen der Reduktasefraktion durch Cytochrom $b_5$ und P420 sind bei säulenchromatographischer Auftrennung geringer.

Nach der Fraktionierung an DEAE liegt das Enzym, bedingt durch die Elution mit KCl, in einer Lösung mit hoher Ionenstärke vor. Diese hohe Ionenstärke ist für die nachfolgende Affinitätschromatographie ungünstig, da dann nur ein kleiner Teil des Enzyms an das Gel bindet. In der Regel führt man in solchen Fällen eine Dialyse oder eine Entsalzung an Sephadex G-25 durch. Beide Möglichkeiten sind hier nicht sehr günstig, die Gelfiltration wegen des großen Volumens und die Dialyse wegen der zu langen Dauer. Daher wurde eine Einengung an Calciumphosphatgel vorgezogen. Die am Ionenaustauscher vorgereinigte Reduktase wurde dabei an Calciumphosphatgel gebunden und mit einem geeigneten Phosphatpuffer wieder abgelöst. Der benutzte Phosphatpuffer ist 0,15 M und ermöglicht eine Bindung der Reduktase an das Affinitätsgel, ohne daß ein weiteres Absenken der Ionenstärke nötig ist. Zusätzlich bringt die Methode eine Volumeneinengung und eine geringe Anreicherung der Reduktase mit Anreicherungsfaktoren zwischen 1,2 und 1,5.
Die eingeengte Fraktion wurde dann durch Affinitätschromatographie an 2'5'-ADP-Sepharose , wie für die Reduktase aus der Rattenleber beschrieben, weiter gereinigt. Im Gegensatz zu diesem Enzym ist aber die Reduktase aus der Schweinenleber nach der Affinitätschromatographie nicht rein. In der SDS-Gelelektrophorese werden bis zu 4 Banden beobachtet.

Bis zur elektrophoretischen Reinheit waren daher weitere Fraktionierungsschritte nötig. Yasukochi und Masters (44) führen bei ihrer Isolierung eine Gelfiltration an Ultrogel ACA 34 unmittelbar nach der Ionenaustauschchromatographie durch. Dieser Schritt setzt eine Volumeneinengung der an der DEAE gewonnenen Reduktasefraktionenen von einem Ausgangsvolumen von ca. 2 l auf etwa 20 bis 30 ml voraus.
Es wurde versucht diese Gelfiltration durch einen anderen Fraktionierungsschritt zu ersetzen. Auf Grund der guten Erfahrungen mit dem Calciumphosphatgel wurde daher die Einengung im "batch"-Verfahren durch eine Säulenchromatographie ersetzt. Die Säulenchromatographie scheiterte zunächst daran, daß die Calciumphosphatgelsäulen zu leicht verstopften. Mischt man aber das Calciumphosphat mit Zellulose im Verhältnis 1 : 1, dann kann man brauchbare Säulen erhalten.
In Abbildung 9 ist das Elutionsdiagramm eines solchen Trennungsganges an Calciumphosphatgel gezeigt.

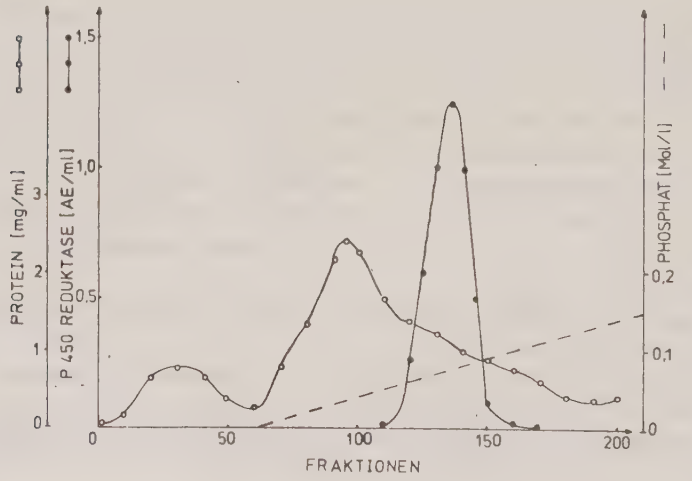



Abb. 9
Chromatographie an Calciumphosphatgel. Die aufgetragene Reduktasefraktion war an DEAE-Sephadex A-50 vorgereinigt.

Die am Ionenaustauscher vorgereinigte Reduktasefraktion wurde sofort auf die Säule aufgetragen. Die Elution wurde über einen Phosphatgradienten vorgenommen. In Vorversuchen waren auch stufenförmige Gradienten gefahren worden, die aber schlechtere Anreicherungen brachten. Daher wurde die Elution durch einen linearen Gradienten vorgezogen.

Nachteil dieser Säulenchromatographie ist, daß das Adsorbens sehr schwierig zu handhaben ist. Wegen der geringen Flußraten dauert das Auftragen der Probe und der Trennungsgang zu lange, so daß Ausbeuteeinbußen in Kauf genommen werden müssen.

Statt der Chromatographie an Calciumphosphatgel wurde daher eine andere Adsorptionschromatographie angewendet. Als Adsorbens wurde dabei Hydroxylapatit benutzt. Dieses bringt in der Trennung ähnlich gute Ergebnisse, ist aber leichter zu handhaben und ermöglicht durch eine höhere Durchflußrate ein schnelleres Arbeiten. Abbildung 10 zeigt ein Elutionsdiagramm.

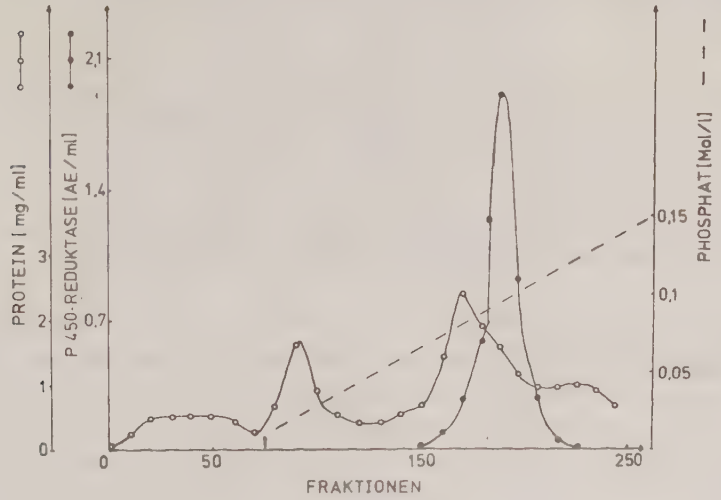



Abb. 10

Chromatographie an Hydroxylapatit. Die aufgetragene Reduktasefraktion war an DEAE-Sephadex A-50 vorgereinigt.

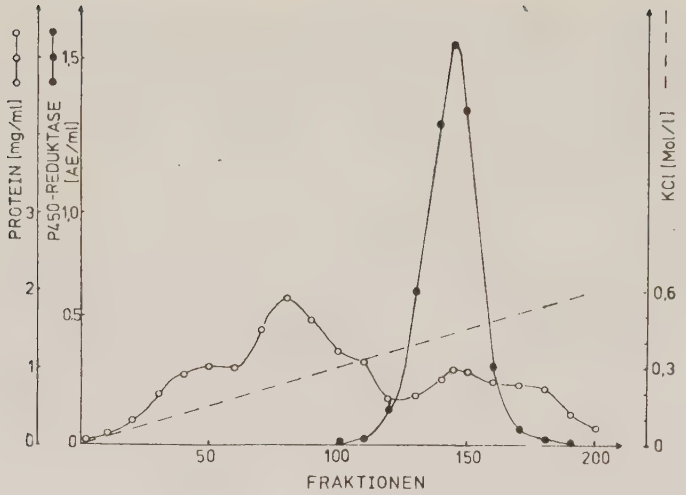



Abb. 11

Chromatographie an ω-Aminooctyl-Sepharose 6B. Die aufgetragene Reduktasefraktion war an DEAE-Sephadex A-50 vorgereinigt.

An Stelle der Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit oder Calciumphosphatgel wurde auch eine Fraktionierung an ω-Aminooctyl-Sepharose durchgeführt. Damit wurden bisher die besten Ergebnisse erzielt und die Säule hat sich gut bewährt. Trennungskriterium ist hier die Hydrophobizität der Proteine. Daneben spielen auch Ionenaustauscheffekte eine Rolle.
Vergleichsdaten zur Fraktionierung an Hydroxylapatit und der hydrophobisierten Sepharose sind aus Tabelle 7 ersichtlich.

Nach dem zweiten Fraktionierungsschritt, der, wie eben dargestellt, an verschiedenen Adsorbentien vorgenommen werden kann, wurde die Affinitätschromatographie durchgeführt. Danach ist die Reduktase in der Regel rein und zeigt in der SDS-Gelelktrophorese nur eine Bande.

Bei einigen Reinigungen wurde nach der Affinitätschromatographie in der SDS-Gelelektrophorese noch eine zweite schneller wandernde Bande beobachtet. Eine Abtrennung dieser Bande ist weder an der Affinitätssäule noch am DEAE-Ionenaustauscher oder Hydroxylapatit möglich, gelingt aber durch Gelfiltration an Ultrogel AcA 34.
Diese Verunreinigung der isolierten Reduktasefraktion trat nur bei einigen Isolierungen auf. Sie wurde besonders dann beobachtet, wenn die ersten Schritte der Reinigung Mikrosomenpräparation, Solubilisierung und Ionenaustauschchromatographie nicht zügig durchgeführt werden konnten. Wird während dieser Arbeitsgänge ein Proteaseinhibitor wie p-Toluolsulfonsäurefluorid (69) in einer 1 mM Konzentration eingesetzt, dann nehmen die Verunreinigungen ab.

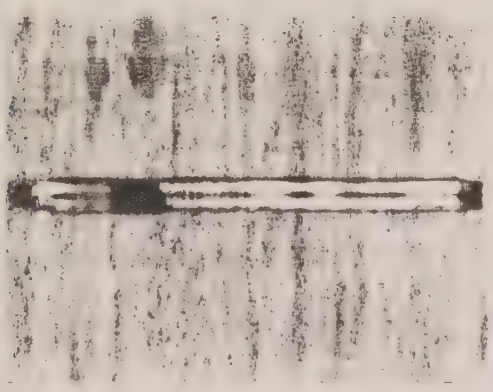


Abb. 12
SDS-Gelelektrophorese der P450-Reduktase aus Schweineleber

| Reinigungsschritt | Gesamt-aktivität (AE) | Gesamt-protein (mg) | spezifische Aktivität (AE/mg) | Anrei-cherung | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Mikrosomen | 775 | 8970 | 0,086 | - | 100 |
| solubilisierte Mikrosomen (Renex + Ultra-schall) | 816 | 8540 | 0,095 | 1,1 | 105 |
| DEAE-Sephadex A-50 | 527 | 810,8 | 0,65 | 7,5 | 68 |
| Hydroxylapatit | 434 | 187,1 | 2,32 | 26,9 | 56 |
| 2'5'-ADP-Sepharose | 294,5 | 7,0 | 41,91 | 487 | 38 |

| Reinigungsschritt | Gesamt-aktivität (AE) | Gesamt-protein (mg) | spezifische Aktivität (AE/mg) | Anrei-cherung | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Mikrosomen | 940 | 13720 | 0,068 | - | 100 |
| Solubilisierte Mikrosomen (Renex + Ultra-schall) | 1061 | 13590 | 0,078 | 1,1 | 113 |
| DEAE-Sephadex A-50 | 614 | 739,6 | 0,83 | 12,2 | 65 |
| ω-Aminooctyl-Sepha-rose | 448 | 128,0 | 3,50 | 40,7 | 48 |
| 2'5'-ADP-Sepharose | 319,6 | 7,4 | 43,2 | 635 | 34 |

Tab. 7
Anreicherungsschemata für die P450-Reduktase aus Schweineleber

Für die gereinigte P450-Reduktase aus Schweineleber wurden mit Dichlorphenolindophenol als Elektronenakzeptor spezifische Aktivitäten zwischen 41 und 50 AE/mg Protein bestimmt.

Abbildung 13 zeigt die Flavinspektren der isolierten Reduktase.
Die oxidierte Form des Enzyms hat Absorptionsmaxima bei 455 und 380 nm mit einer Schulter bei 480 nm, die anzeigt, daß sich die Flavine in einer hydrophoben Umgebung befinden. Durch Zugabe von NADPH wird das Enzym in einen semichinoiden Zustand überführt, der dadurch gekennzeichnet ist, daß eines der beiden Flavine ein Elektron aufnimmt.

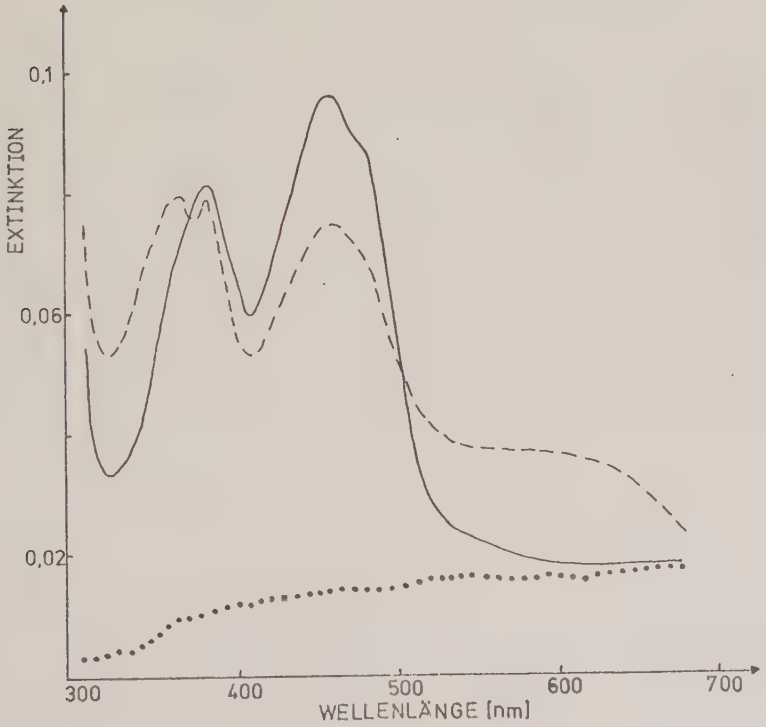



Abb. 13
Spektren der P450-Reduktase aus Schweineleber
——— oxidiertes Enzyn
– – – – Semichinon, gebildet nach Zugabe von 8 nMol NADPH pro nMol Enzym
..... Photometer-grundlinie

Die oxidierte und semichinoide Form des Enzyms haben in ihren Spektren isosbestische Punkte bei 360 und 490 nm.

Die Semichinonform ist auch in Gegenwart von Sauerstoff sehr stabil. Nach Reduktion des Enzyms mit NADPH, wobei pro Mol Enzym 8 Mol NADPH eingesetzt wurden, blieb die Semichinonform länger als zwei Tage erhalten.
Als Semichinon wird das Enzym auch isoliert, wenn die bei den Chromatographien benutzten Elutionslösungen Dithioerythrit enthalten. Zur Oxidation des Enzyms kann Ferricyanid benutzt werden.

### III.3. Isolierung der Enzyme des mikrosomalen Fremdstoff-monooxygenasesystems aus Schweineleber

Die Isolierung der P450-Reduktase war als Einstieg in die Isolierung der Enzyme des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenasesystems benutzt worden.
Dabei ergab sich für das angestrebte Ziel ein wesentlicher Hinweis, nämlich die Auftrennung an DEAE-Sephadex A-50. Diese sollte jetzt auch für die Präparation der übrigen Enzyme des Systems nutzbar gemacht werden.
Von Beginn der Arbeiten an zeigte es sich, daß Cytochrom P450 von allen zu reinigenden Proteinen am schwierigsten zu handhaben war. Daher wurden bei den einzelnen Schritten der Präparation die Bedingungen jeweils so gewählt, daß sie für P450 optimiert waren.

#### III.3.1. Solubilisierung der Enzyme des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenasesystems

Die bei der Solubilisierung der P450-Reduktase angewendeten Solubilisierungstechniken sind für P450 ungeeignet, da sowohl bei der Verwendung von Desoxycholat als auch der Beschallung mit Ultraschall, wenn auch in geringerem Maße,

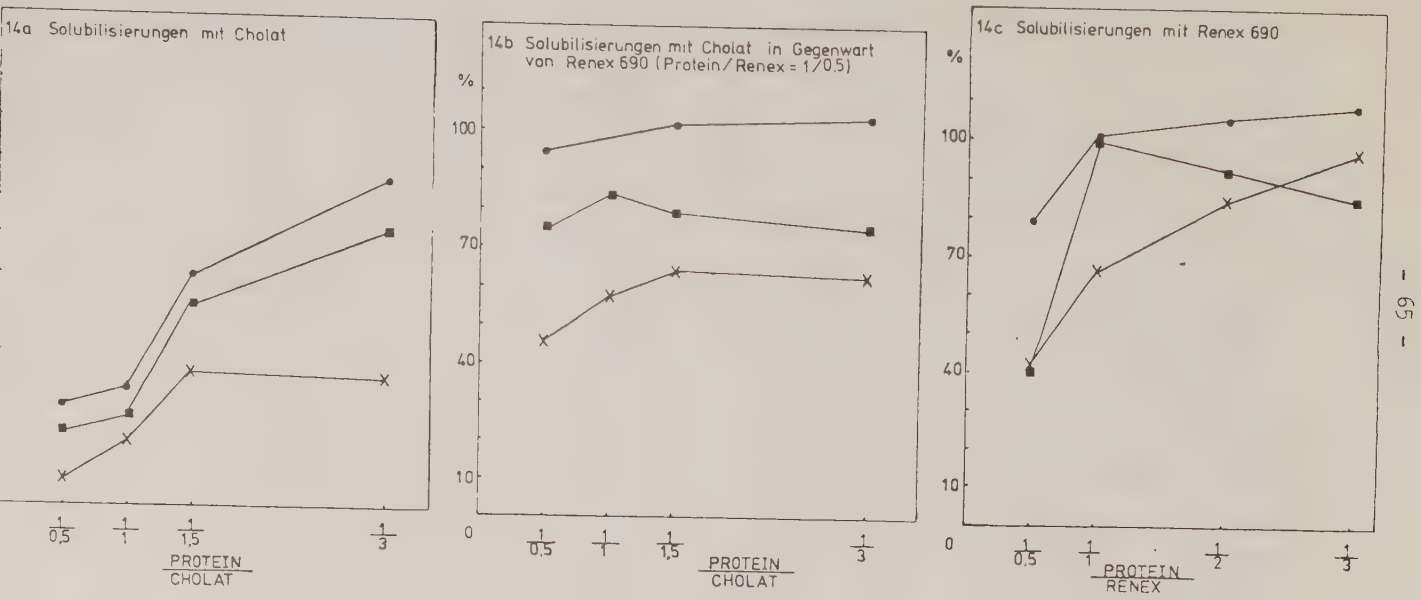



Abb. 14 a - c

Solubilisierungen mit Renex und Natriumcholat.
Schweinelebermikrosomen wurden bei einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml mit unterschiedlichen Mengen der beiden Detergentien versetzt. Die solubilisierten Enzyme wurden durch eine Zentrifugation von der Membranfraktion getrennt. Im Überstand wurden die solubilisierten Enzyme bestimmt. Ihre Aktivitäten bzw. Konzentrationen sind prozentual, bezogen auf die Ausgangsmenge in der Mikrosomenfraktion, angegeben.

Denaturierungen zum P420 auftreten.
Bei den Solubilisierungen von P450 wurden daher die Detergentien Renex 690 und Natriumcholat verwendet.
Die Ergebnisse verschiedener Solubilisierungen sind in Abbildung 14 dargestellt. Mit steigenden Mengen von Cholat werden, wie Abbildung 14a zeigt, P450 und die P450-Reduktase zunehmend aus der Membran gelöst. Während $b_5$ bei einem dreifachen Cholatüberschuß nur zu 39 % solubilisiert wird, erreichen P450 und die Reduktase dabei Werte von 72 bzw. 85 %.

Werden die Solubilisierungen mit unterschiedlichen Cholatkonzentrationen in Gegenwart konstanter Renexmengen, Abbildung 14b, durchgeführt, dann sind die Ausbeuten, besonders bei niedrigen Cholatkonzentrationen, deutlich erhöht.
Die P450-Ausbeuten erreichen bei einem Protein/Cholat-Verhältnis von 1 : 1 ein Maximum. Bei weiterer Steigerung der Cholatkonzentrationen nehmen die Ausbeuten wieder ab.
Unter diesen Bedingungen wird die P450-Reduktase schon bei der niedrigsten Cholatkonzentration nahezu vollständig aus der Membran gelöst.
Deutlich wird bei allen drei Proteinen der starke solubilisierende Effekt von Renex 690. Eine Steigerung der Cholatmengen in Gegenwart der konstanten Renexkonzentration bewirkt nur noch ein geringfügiges Ansteigen der Ausbeuten.

Abbildung 14c zeigt Solubilisierungsausbeuten bei unterschiedlichen Renexkonzentrationen. Auch hier nehmen die P450-Ausbeuten nach einem Maximum bei einem Protein/Renex-Verhältnis von 1 : 1 mit steigender Detergentienmenge wieder ab.
Bei der Solubilisierung mit maximaler P450-Ausbeute wird die P450-Reduktase mit einer Ausbeute von 100 % und $b_5$ mit einer Ausbeute von 66,5 % aus der Membran gelöst.
Im Gegensatz zu den Solubilisierungen mit Cholat wird hier auch für $b_5$ bei der höchsten Detergentienkonzentration eine Ausbeute erzielt, die nahe an 100 % heranreicht.

Von allen ausgeführten Solubilisierungen scheint die bei einem Protein/Renex-Verhältnis von 1 : 1 durchgeführte Solubiliserung am ehesten für die Isolierung des Systems geeignet, denn sie erbringt für P450 und die P450-Reduktase Ausbeuten von annähernd 100 %, lediglich $b_5$ wird mit 66,5 % in einer geringeren Ausbeute erhalten. Eine Steigerung der $b_5$-Ausbeuten durch Erhöhung der Detergentienkonzentration ist nicht sinnvoll, da damit P450-Verluste verbunden sind.

Neben den Ausbeuten ist noch ein zweites Kriterium für die Beurteilung einer Solubilisierung wichtig, das ist die Stabilität der Proteine unter den Solubilisierungsbedingungen. Dies ist hier deshalb besonders wichtig, weil, bedingt durch die niedrige Proteinkonzentration von 5 mg/ml bei der Solubilisierung, große Volumina vorhanden sind. Die Weiterverarbeitung dieser Volumina, insbesondere die notwendige Zentrifugation, nimmt einige Zeit in Anspruch, so daß durch eine herabgesetzte Stabilität der Enzyme die Ausbeuten während der notwendigen Arbeitszeit noch weiter absinken können.

Versuche die Solubilisierungen bei höheren Proteinkonzentrationen als 5 mg/ml durchzuführen waren wenig erfolgreich. Insbesondere beim P450 wurden bei höheren Proteinkonzentrationen bei der Solubilisierung durchweg schlechtere Ausbeuten erzielt.

Die in Abbildung 14a-c dargestellten Solubilisierungsexperimente wurden daher wiederholt und im Unterschied zur ersten Meßreihe wurden jetzt die aus der Membran herausgelösten Enzyme nicht unmittelbar nach der Solubilisierung, sondern erst zwei Stunden später bestimmt.
Nach Zugabe der jeweiligen Detergentien wurde eine zusätzliche Inkubationszeit von zwei Stunden eingehalten, ehe die Zentrifugation durchgeführt wurde. Durch diese Versuchsanordnung sollte die Stabilität der Proteine unter den jeweiligen Solubilisierungen stärker in das Ergebnis eingehen.

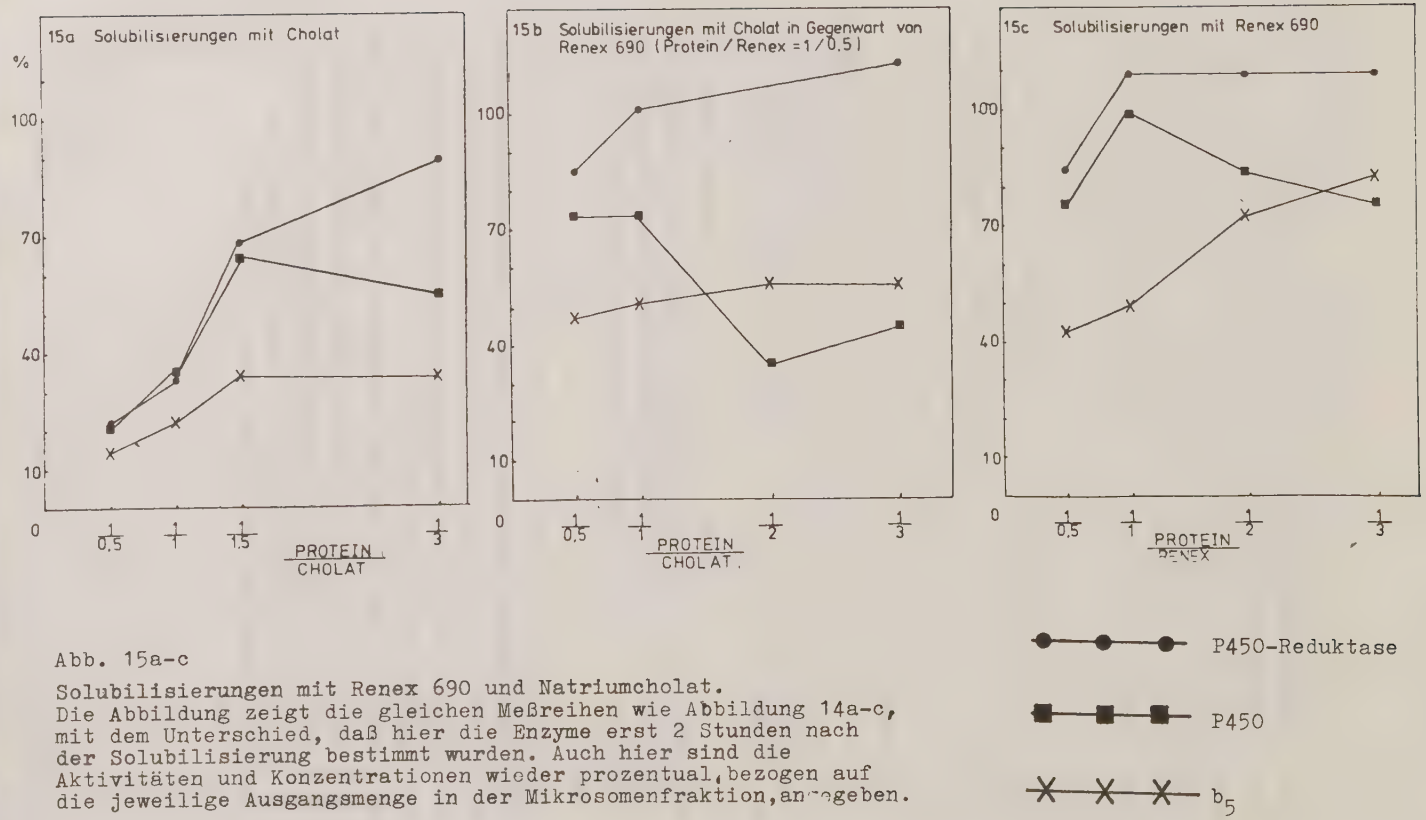



Abb. 15a-c

Solubilisierungen mit Renex 690 und Natriumcholat.
Die Abbildung zeigt die gleichen Meßreihen wie Abbildung 14a-c, mit dem Unterschied, daß hier die Enzyme erst 2 Stunden nach der Solubilisierung bestimmt wurden. Auch hier sind die Aktivitäten und Konzentrationen wieder prozentual, bezogen auf die jeweilige Ausgangsmenge in der Mikrosomenfraktion, angegeben.

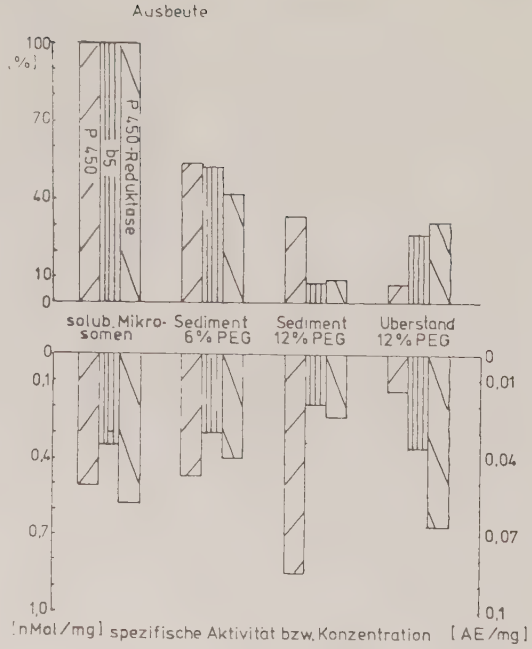
Die Ergebnisse dieser zweiten Versuchsserie sind in der Abbildung 15a-c wiedergegeben.
In allen drei Meßreihen zeigen $b_5$ und die P450-Reduktase unveränderte Ergebnisse. Die beiden Proteine sind also unter allen gewählten Bedingungen stabil, und es kommt nicht zu einem Absinken der Ausbeuten durch Inaktivierungen oder Denaturierungen.
Beim P450 hingegen sieht man deutliche Effekte.
In Gegenwart hoher Cholatkonzentrationen, Abbildung 15a und 15b, finden offensichtlich Denaturierungen statt, die zu einer Erniedrigung der Ausbeuten führen.
Die destabilisierende Wirkung von Cholat auf P450 bei der Solubilisierung wurde auch dann beobachtet, wenn das verwendete Cholat vor Gebrauch durch zweifaches Umkristallisieren in 50 %igem Äthanol gereinigt worden war.
Cholat ist für die Solubilisierung der Schweinelebermikrosomen ungeeignet. Es löst weniger Protein aus der Membran als Renex 690 und wirkt zudem noch destabilisierend auf P450.

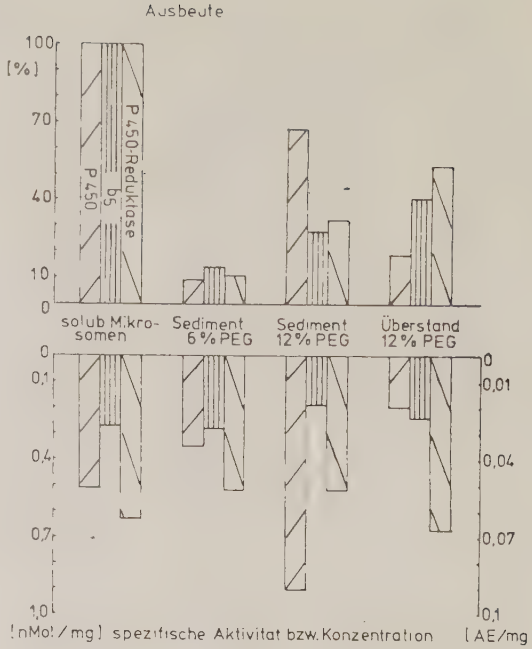
Bei der Solubilisierungsreihe nur mit Renex, Abbildung 15c, hat die zusätzliche zweistündige Inkubationszeit keinen nachteiligen Einfluß auf das Ergebnis. In beiden Meßreihen wird hier bei einem Protein/Renex-Verhältnis von 1 : 1, Abbildung 14c und 15c, eine annähernd hundertprozentige P450-Ausbeute erreicht.
Als Methode für die Isolierung der Proteine des Fremdstoffmonooxygenasesystems wurde daher die Solubilisierung mit Renex 690 übernommen. Diese Solubilisierung wurde bei einem Protein/Renex-Verhältnis von 1 : 1 und bei einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml durchgeführt.

### III.3.2. Polyäthylenglykolfällungen

Die mit der erarbeiteten Methode solubilisierten Mikrosomen sollten an DEAE-Sephadex A-50 fraktioniert werden.
Es stellte sich aber heraus, daß am Ionenaustauscher gebundenes P450 sehr instabil ist und daher war es nötig, diesen Trennungsschritt möglichst rasch durchzuführen. Dem stand das große Volumen der solubilisierten Mikrosomen entgegen. Daher wurde versucht, diese Fraktion vor der Ionenaustauschchromatographie einzuengen. Methodisch sollte dies durch Polyäthylenglykolfällungen erreicht werden.

Abbildung 16 zeigt eine Auftrennung der solubilisierten Mikrosomen mit PEG in drei Fraktionen. Bei einer 6 %igen PEG-Konzentration werden sowohl P450 und $b_5$ als auch die P450-Reduktase ausgefällt, ohne daß dabei für eines der drei Enzyme eine Anreicherung zu verzeichnen ist. Bei einer 12 %igen PEG-Konzentration hingegen findet eine Trennung statt. P450 befindet sich angereichert im Sediment, während $b_5$ und die P450-Reduktase im Überstand verbleiben.
Auch wenn man andere Fraktionierungsgrenzen wählt und die erste Fällung statt bei 6 % bei 4, 5 oder 7 % PEG durchführt, macht man die gleiche Beobachtung. Im ersten Sediment werden unabhängig von den jeweiligen Fällungsgrenzen alle drei gemessenen Enzyme zu einem beträchtlichen Anteil, der zwischen 30 und 60 % liegt, abgetrennt. Offensichtlich fällt bei niedrigen PEG-Konzentration ein Teil der Proteine unspezifisch aus. Die im Überstand verbliebenen Proteine hingegen verhalten sich dann individuell und können mit Hilfe von PEG voneinander getrennt werden.
Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten der Proteine könnte in der Beschaffenheit der solubilisierten Mikrosomen liegen. Diese Fraktion besteht sicherlich nicht nur aus einzelnen solubilisierten Proteinen, sondern auch aus verschiedenen aus Proteinen und Lipiden zusammengesetzten Aggregaten. Das läßt sich auch äußerlich an der leichten Trübung dieser Fraktion erkennen.




b. 16

aktionierung solubilisierter Mikrosomen mit Poly-
ylenglykol. Nach oben sind die prozentualen Aus-
aten, bezogen auf die jeweilige Enzymmenge in den
ubilisierten Mikrosomen, und nach unten die spezi-
schen Aktivitäten aufgetragen,

Abb. 17

Fraktionierung solubilisierter Mikrosomen mit Poly-äthylenglykol. Nach oben sind die prozentualen Ausbeuten, bezogen auf die jeweilige Enzymmenge in den solubilisierten Mikrosomen und nach unten die spezifischen Aktivitäten aufgetragen. Vor der Fällung war zusätzlich noch einmal Renex 690 zugegeben worden, pro 100 ml Lösung 5 ml 10 %ige Renex.

Diese Aggregate sollten auf Grund ihrer Größe schon bei niedrigen PEG-Konzentrationen ausfallen und damit würden alle an der Aggregatbildung beteiligten Proteine unspezifisch mitabgetrennt werden. Die nicht in solchen Aggregaten gebundenen Proteine hingegen sind wegen ihres unterschiedlichen Fällungsverhalten mit PEG fraktionierbar.
Wenn diese Überlegung richtig ist, dann sollte durch weiteren Zusatz von Detergentien das unspezifische Ausfallen vermindert werden. Das ist, wie Abbildung 17 zeigt, auch der Fall. Hierbei wurde nach der Solubilisierung zu der durch Zentrifugation abgetrennten Fraktion noch einmal Renex 690 gegeben und zwar in der gleichen Menge wie bei der Solubilisierung selbst. Die nochmalige Detergentienzugabe bewirkt eine Klärung der getrübten Lösung.
In der anschließenden Fällung bei 6 % PEG wird nur noch ein kleiner Anteil der Enzyme im Sediment nachgewiesen. Dafür ist der jeweilige Anteil in den beiden Fraktionen bei 12 % PEG erhöht.
Die Menge der unspezifisch bei niedrigen PEG-Konzentrationen ausfallenden Enzyme ist von der zugegebenen Detergentienmenge abhängig. Je mehr Detergens verwendet wird, desto geringer wird der P450-Anteil im Sediment bei 6 % PEG. Bei einem großen Überschuß an Detergens kann das Ausfallen von P450 hier sogar ganz vermieden werden. Allerdings gehen die Ausbeuten in den anderen Fraktionen dann merklich zurück, so daß die Gesamtmenge von P450 in allen Fraktionen auf weniger als die Hälfte der Ausgangsmenge in den solubilisierten Mikrosomen abnimmt. Auch hier wird also wieder eine Denaturierung von P450 in Gegenwart hoher Detergentienkonzentrationen beobachtet. Die höchsten Ausbeuten im Sediment bei 12 % PEG wurden dann erreicht, wenn vor der Fällung noch einmal die gleiche Menge Renex wie bei der Solubilisierung zugegeben wurde.

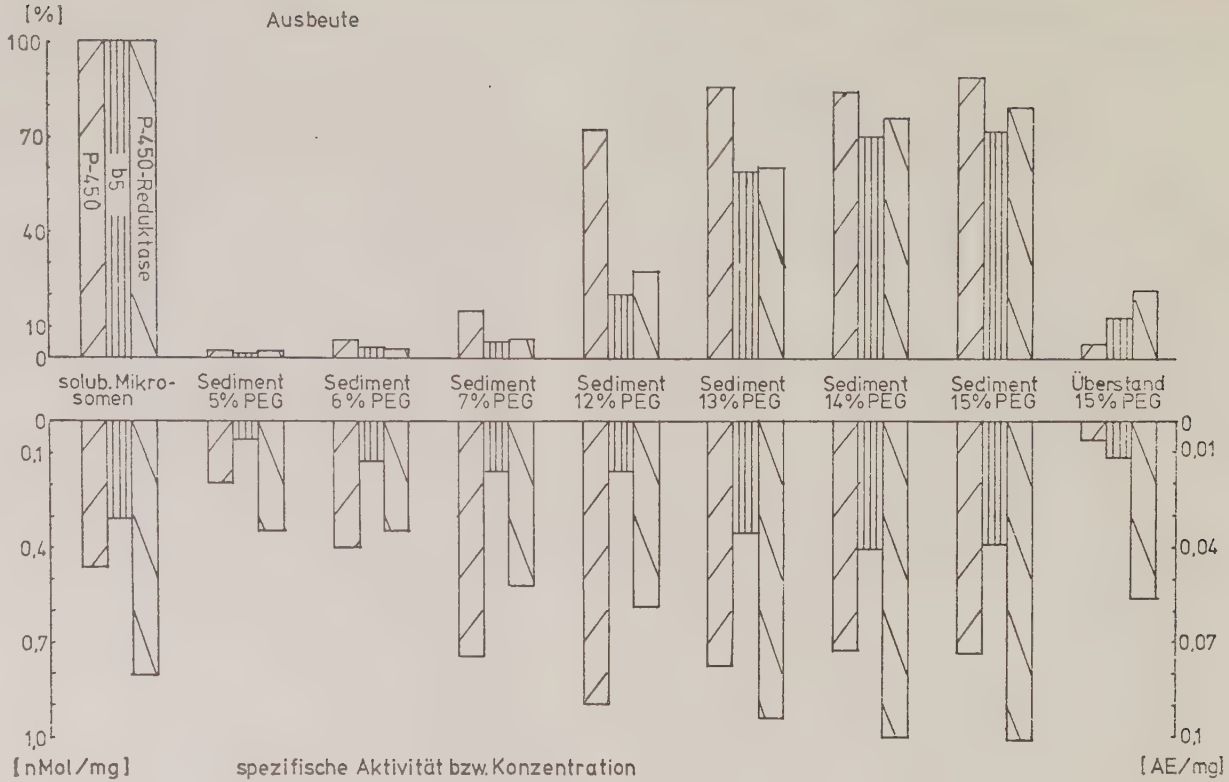



Abb. 18

Fraktionierung solubilisierter Mikrosomen mit Polyäthylenglykol.
Vor der PEG-Zugabe war noch einmal Renex 690 zugesetzt worden, 5 ml 10 %ige Renexlösung pro 100 ml solubilisierter Mikrosomen.

In nachfolgenden Fällungen wurden dann die geeigneten Fraktionierungsgrenzen ermittelt. Angestrebt wurde eine Vereinigung der drei gemessenen Enzyme in einer Fraktion oder eine vollständige Trennung.
Abbildung 18 zeigt eine Fraktionierung von solubilisierten Mikrosomen nach nochmaliger Detergentienzugabe mit Fällungen bei 5, 6, 7, 12, 13, 14 und 15 % PEG.
Eine Abtrennung von P450 von $b_5$ und der P450-Reduktase ist nur unvollständig möglich. Das Sediment bei 12 % PEG enthält 72,5 % der P450-Ausgangsmenge. In dieser Fraktion ist das Cytochrom etwa 2fach angereichert. Daneben sind in dem Sediment 27 % der P450 Reduktase und 20 % der $b_5$-Ausgangsmenge enthalten. Wird die Fällung statt bei 12 % bei 13 % PEG durchgeführt, steigt die P-450-Ausbeute auf 86 % an. Einen wesentlich stärkeren Anstieg verzeichnen die Reduktase und $b_5$ auf 70 bzw. auf 69 %. Beim weiteren Anheben der Fraktionierungsgrenzen auf 14 und 15 % erhöhen sich die Ausbeuten nur noch wenig. Der Überstand bei 15 % PEG enthält nur einen geringen Anteil der drei Proteine. Am stärksten vertreten ist hier die P450-Reduktase mit 21 % Ausbeute. Durch einen hohen Anteil von Fremdprotein ist die spezifische Aktivität aber niedrig.

Da die Auflösung der PEG-Fällungen nicht genügte, um eines der drei Proteine von den übrigen vollständig abzutrennen, wurden die Fällungsgrenzen so gewählt, daß die drei Proteine in einer Fraktion gewonnen wurden. Dazu wurde zunächst eine Fällung bei einer 6 %igen PEG-Konzentration durchgeführt. Das dabei ausgefällte Protein wurde durch eine Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Der Überstand wurde auf 15 % PEG gebracht und das ausgefällte Protein wurde wiederum absedimentiert. Im Sediment sind die Enzyme des mikrosomalen Monooxygenasesystems in hoher Ausbeute etwa 1,5fach angereichert enthalten. Eine Zusammenstellung von Ausbeuten und spezifischen Aktivitäten gibt Tabelle 8. In dieser Tabelle ist auch die $b_5$-Reduktase miterfasst, die anfänglich noch nicht mitgemessen wurde.

| Enzym | solub. Mikrosomen | | Sediment 15 % PEG | |
|---|---|---|---|---|
| | Ausbeute (%) | spez.Akt. (AE/mg) (nMol/mg) | Ausbeute (%) | spez.Akt. (AE/mg) (nMol/mg) |
| P450 | 100 | 0,46 ± 0,08 | 81,0 ± 11,8 | 0,73 ± 0,13 |
| $b_5$ | 100 | 0,24 ± 0,07 | 74,6 ± 6,6 | 0,35 ± 0,05 |
| P450-Reduktase | 100 | 0,08 ± 0,02 | 76,1 ± 7,2 | 0,11 ± 0,02 |
| $b_5$-Reduktase | 100 | 4,12 ± 0,39 | 86,7 ± 5,7 | 7,95 ± 1,70 |

Tab. 8

Ergebnisse von Polyäthylenglykolfällungen mit Fällungsgrenzen bei 6 % und 15 % PEG. Angegeben sind die Mittelwerte von 4 Fällungen.

Die erzielten Anreicherungen rechtfertigen nicht den Aufwand der PEG-Fällungen. Wichtigstes Ergebnis ist vielmehr eine etwa zehnfache Volumenverminderung durch die Fällung. Dadurch erst wird eine schnelle und erfolgreiche Durchführung der nachfolgenden Ionenaustauschchromatographie möglich.

### III.3.3. Auftrennung des Monooxygenasesystems an DEAE-Sephadex A-50

Bei der Reinigung der P450-Reduktase war am DEAE-Ionenaustauscher eine Auftrennung des Monooxygenasesystems beobachtet worden. Wegen der angewendeten Solubilisierung und wegen der Anwesenheit von Desoxycholat bei der Chromatographie lag P450 dabei als Denaturierungsprodukt P420 vor.

Um die beobachtete Auftrennung auch für die Isolierung von P450 nutzbar zu machen, wurde die Chromatographie nun in Abwesenheit von Desoxycholat wiederholt. Die aufgetragene Fraktion war vorher nach der erarbeiteten Methode mit Renex solubilisiert worden.
Auch unter diesen Bedingungen wurden beim P450 in hohem Maße Denaturierungen festgestellt, die so stark waren, daß die P450-Ausbeuten bei diese Trennung unter 10 % lagen.
Nach mehrfacher Durchführung der Chromatographie unter verschiedenen Bedingungen stellte es sich heraus, daß das Ausmaß der Denaturierung im wesentlichen von zwei Faktoren abhängig ist, nämlich der Dauer des Trennungsganges und der Höhe der Detergentienkonzemtration.
An DEAE gebundenes P450 ist instabil. Daher muß dieser Arbeitsgang möglichst schnell durchgeführt werden. Die verwendeten Säulen ließen Durchlaufgeschwindigkeiten von circa 100 ml/h zu. Die Einengung der aufzutragenden Fraktion durch PEG-Fällungen von einem Ausgangsvolumen von 3 l auf ein Volumen von 300 bis 400 ml ermöglicht daher eine Zeitersparnis von mehr als 24 Stunden und ist damit eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung der Ionenaustauschchromatographie.
Zweiter wichtiger Faktor für die Höhe derAusbeuten sind die Detergentienkonzentrationen. Am besten bewährt haben sich im Äquilibrierungspuffer 0,5 %ige und in den KCl-haltigen Elutionspuffern 0,25 %ige Renex-Konzentrationen.

Unter diesen Bedingungen sind die Denaturierungen zu P420 vernachlässigbar gering oder werden gar nicht beobachtet. Bei höheren Detergentienkonzentrationen wurden in jedem Fall Denaturierungen festgestellt, die umso höher waren, je mehr Renex verwendet wurde. Bei niedrigeren Detergentienkonzentrationen verschlechtert sich die Auftrennung und die Anreicherungen nehmen ab.

Wie Abbildung 19 zeigt, werden die Proteine am Ionenaustauscher in 4 Fraktionen aufgetrennt. Die ersten beiden Fraktionen enthalten P450 . Sie werden im Leervolumen eluiert und dabei nur unvollständig voneinander getrennt. Der Reihenfolge ihrer Elution am Ionenaustauscher entsprechend werden sie als P450 I und P450 II bezeichnet.

Bei einer 0,12 M KCl-Konzentration wird die nächste Enzymfraktion abgelöst. In dieser Fraktion sind P450 III, $b_5$ und $b_5$-Reduktase enthalten. Nach weiterer Erhöhung der KCl-Konzenauf 0,32 M wird die P450-Reduktase eluiert.

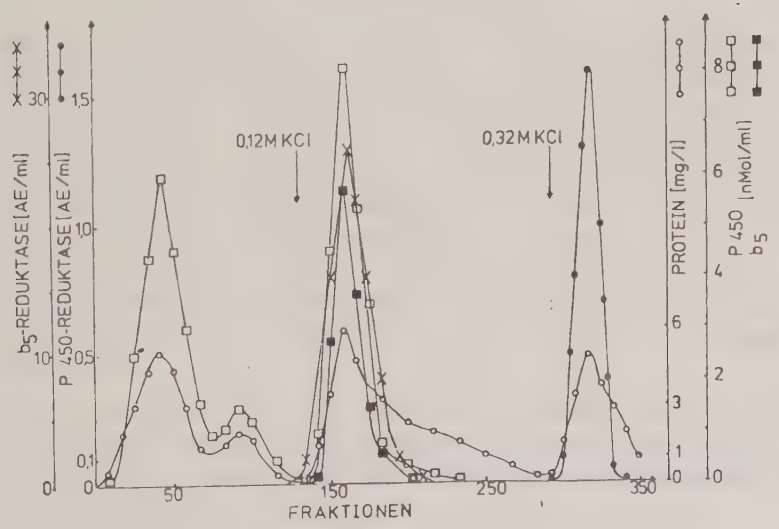



Abb. 19

Auftrennung von solubilisierten Schweinelebermikrosomen an DEAE-Sephadex A-50 nach Vorreinigung durch PEG-Fällungen.

Eine Bilanz der bisherigen Enzymisolierungen zeigt Tabelle 9.

| Reinigungschritt | Enzym | Protein (mg) | Aktivität/ Konzentr. (AE) / (nMol) | spez.Akt./ Konzentr. (AE/mg) / (nMol/mg) | Anreicherung | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Mikrosomen | P 450 | 15.400 | 4.852 | 0,32 | - | 100 |
| | $b_5$ | | 4.032 | 0,26 | - | 100 |
| | P 450-Redukt. | | 714 | 0,05 | - | 100 |
| | $b_5$-Reduktase | | 82.427 | 5,35 | - | 100 |
| solubilisierte Mikrosomen | P 450 | 11.614 | 4.486 | 0,39 | 1,2 | 92,4 |
| | $b_5$ | | 2.498 | 0,21 | - | 61,9 |
| | P 450-Redukt. | | 688 | 0,06 | 1,2 | 96,3 |
| | $b_5$-Reduktase | | 80.323 | 6,92 | 1,3 | 97,4 |
| PEG 6 - 15 % | P 450 | 5.512 | 3.938 | 0,71 | 2,2 | 81,1 |
| | $b_5$ | | 2.270 | 0,41 | 1,6 | 56,3 |
| | P 450-Redukt. | | 614 | 0,11 | 2,2 | 89,2 |
| | $b_5$-Reduktase | | 70.660 | 12,80 | 2,4 | 85,7 |
| DEAE-Sephadex | P 450 I | 1.030 | 1.427 | 1,37 | 4,3 | 29,2 |
| | P 450 II | 154 | 183 | 1,18 | 3,7 | 3,8 |
| | P 450 III | 2.040 | 1.682 | 0,82 | 2,6 | 34,6 |
| | $b_5$ | " " | 2.011 | 0,98 | 3,8 | 49,9 |
| | $b_5$-Reduktase | " " | 39.480 | 19,35 | 3,6 | 47,8 |
| | P 450-Redukt. | 1.327 | 486 | 0,33 | 7,2 | 68,0 |

Tab. 9
Anreicherungsschema der bisherigen Aufarbeitung

Eine Auftrennung in dieser Form wurde unter verschiedenen Elutionsbedingungen beobachtet. Dabei schwankt der Anteil von P450 I und III von Aufarbeitung zu Aufarbeitung, auch wenn das Ausgangsmaterial von der gleichen Schweineleber stammt. Im Mittel liegt das Verhältnis von P450 I / P450 III bei 1 / 1 bei einer Schwankungsbreite von $\pm$ 30 %.
P450 II wurde bei allen Aufarbeitungen nur in geringen Mengen gefunden. Der Anteil von P450 II liegt zwischen 1 und 5 %, bezogen auf die P450-Ausgangsmenge in der Mikrosomenfraktion.

Neben dem Unterschied in ihrem chromatographischen Verhalten unterscheiden sich die drei P450-Fraktionen auch in ihren spektralen Eigenschaften. Es wurden folgende Maxima in den CO-Differenzspektren ermittelt:

| | | |
|---|---|---|
| P450 I | : | 450,0 nm |
| P450 II | : | 449,5 nm |
| P450 III | : | 450,8 nm |

Beim Vergleich des Elutionsdiagramms, Abbildung 19, mit den vorher in Abschnitt III.2.3. gezeigten Diagrammen, Abbildung 7 und 8, zeigen sich deutliche Unterschiede.
Bei der Chromatographie der mit Desoxycholat solubilisierten Mikrosomen an DEAE-Sephadex A-50 in Abwesenheit von Glycerin eluiert P420, das Denaturierungsprodukt von P450, ebenfalls in zwei Fraktionen. Diese werden, verglichen mit P450 hier, erst bei höheren Ionenstärken vom Ionenaustauscher abgelöst. Auch das $b_5$ eluiert in Anwesenheit von Glycerin bei niedrigeren Ionenstärken. Die Reduktase hingegen zeigt unter beiden Bedingungen das gleiche Elutionsverhalten. Dadurch wird hier, in Anwesenheit von Glycerin, eine vollständige Abtrennung der P450-Reduktase von den übrigen Enzymen des Monooxygenasesystems erreicht.

Während P450 bzw. P420 der Schweinelebermikrosomen am Ionenaustauscher immer in mindestens zwei unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt wurde, ist das bei den Rattenlebermikrosomen nicht der Fall, Abbildung 4. Hier wird P450 unter fast identischen Chromatographiebedingungen nur in einer Fraktion gewonnen.

III.4. Reinigung von P-450 I

Die am DEAE-Ionenaustauscher gewonnene Fraktion von P450 I muß zügig weiterverarbeitet werden, da das Cytochrom in der Elutionslösung wenig stabil ist. Besonders wichtig ist eine rasche Senkung der Detergentienkonzentration. Dazu wurden mehrere Verfahren angewendet.
Gerne benutzt zur Entfernung nichtionischer Detergentien wird Sephadex LH-20 (73).
Die Durchführung erfolgte wie bei Ryan et al. (74) beschrieben. Dabei wurde die Proteinfraktion über eine Sephadex LH-20-Säule gegeben. Während die Proteine im Leervolumen eluierten, blieb Renex am Gel gebunden. Dieses Verfahren ist bei kleinen Probenvolumina günstig. Hier ist es weniger brauchbar, da wegen des großen Volumens eine schnelle Durchführung nicht möglich ist.
Günstiger ist ein Absenken der Detergentienkonzentration über Bio-Beads SM-2 nach Holloway (75). Diese Methode wird im "batch"-Verfahren durchgeführt und erlaubt daher eine schnellere Arbeitsweise.
Die beiden Verfahren erbringen zwar die gewünschte Verminderung der Renex-konzentration, aber sie leisten keinen Beitrag zu einer weiteren Anreicherung von P450.
Daher wurden weitere Methoden erprobt, um dasein mit dem anderen zu verbinden. Aus der Literatur sind dazu zwei Möglichkeiten bekannt, nämlich der Gebrauch von PEG (74) und von Calciumphosphatgel (76).
Beide Möglichkeiten sind gut brauchbar. Sie erbringen eine Volumeneinengung und Anreicherung von P450 und dazu wird, wie angestrebt, die Detergentienkonzentration gesenkt und kann auf einen geeigneteren Wert eingestellt werden.
Vorgezogen wurde die Benutzung von Calciumphosphatgel, weil die Methode schnell durchführbar und wenig fehleranfällig ist. Darüberhinaus liefert sie, verglichen mit PEG, das vor der

Ionenaustauschchromatographie schon angewendet wurde, ein neues Trennungskriterium.
Versuche an dieser Stelle eine Ammonsulfatfällung durchzuführen schlugen fehl, da keine Bedingungen gefunden werden konnten, unter denen P450 bei der Trennung stabil bleibt.

Bei der Einengung an Calciumphosphatgel wurde das Probenvolumen etwa um einen Faktor von 3 vermindert. Die erreichten Anreicherungen lagen zwischen 1,2 und 1,5. Ins Gewicht fallende Abnahmen der P450-Ausbeuten wurden nicht beobachtet.

Die weitere Isolierung von P450 I wurde an Anilin-Sepharose durchgeführt. In Abbildung 20 ist die Darstellung von Anilin-Sepharose gezeigt.

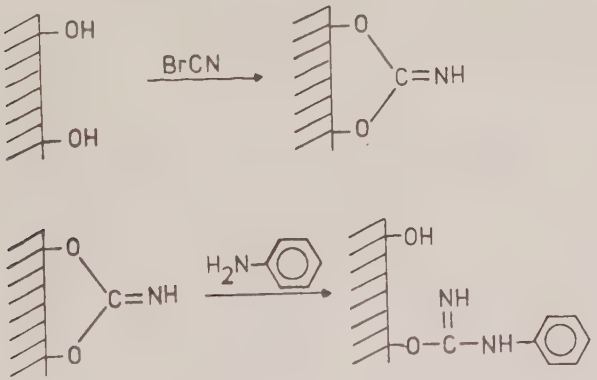



Abb. 20
Darstellung von Anilin-Sepharose.
Die schraffierte Fläche stellt die Gelmatrix dar.

Wegen der geringen Stabilität des Cytochroms ist auch hier schnelles Arbeiten vonnöten. Die besten Ergebnisse wurden bei einem pH-Wert von 7,4 in Gegenwart von 20 % Glycerin erzielt. Bewährt haben sich Zusätze von Anilin, Cyclohexan und Biphenyl in den Elutionspuffern. Diese Verbindungen wirken stabilisierend und helfen, die P450-Verluste gering zu halten.
Unter den gewählten Bedingungen bindet P450 sehr fest an Anilin-Sepharose. Die Elution des gebundenen Cytochroms kann auf verschiedenen Wegen herbeigeführt werden. Dazu gehören Steigerung des pH-Wertes im Elutionspuffer, Erniedrigung der Phosphat- und Erhöhung der Glycerin- und Detergentienkonzentrationen. Als besonders geeignet erwies sich eine Elution mit abnehmender Phosphat- und gleichzeitiger Erhöhung der Detergentienkonzentrationen. Ein Elutionsdiagramm dazu zeigt Abbildung 21.

Die dabei abgetrennte P450-Fraktion wurde sofort weiterverarbeitet und nach Zugabe von Ammoniumsulfat noch einmal an Anilin-Sepharose chromatographiert. Die Elution erfolgte anschließend mit einem abfallenden Ammonsulfatgradienten. In Abbildung 22 ist ein Elutionsdiagramm dieser Chromatographie dargestellt.

Es erweist sich, daß die P450 I -Fraktion noch heterogen zusammengesetzt ist. Unter den gewählten Chromatographiebedingungen erhält man eine Auftrennung in zwei P450-Fraktionen. Die erste kleinere P450-Fraktion, die bei hohen Ammonsulfatkonzentrationen eluiert, wurde P450 Ia und die bei niedrigeren Ionenstärken abgelöste Fraktion wurde P450 Ib genannt.
P450 Ia macht mengenmäßig nur etwa ein Fünftel von P450 Ib aus. Wegen der geringen Menge und der niedrigen spezifischen Konzentration wurde eine weitere Anreicherung nicht versucht.

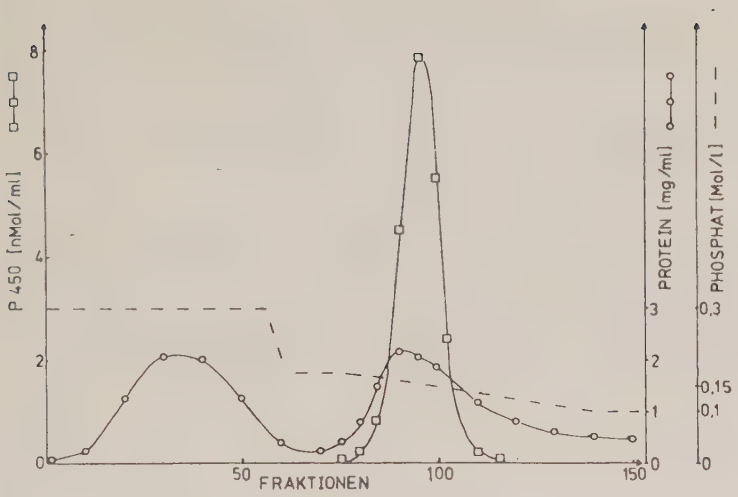



Abb. 21
Erste Fraktionierung von P450 I an Anilin-Sepharose

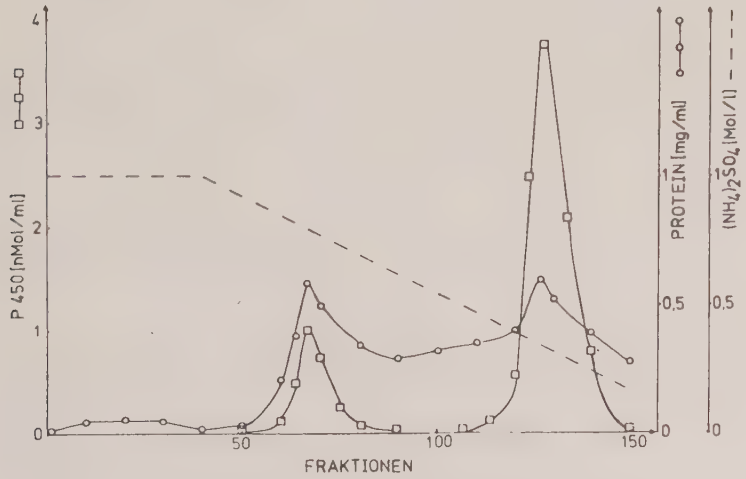



Abb. 22
Zweite Fraktionierung von P450 I an Anilin-Sepharose

Neben dem unterschiedlichen chromatographischen Verhalten weisen die beiden Fraktionen auch Unterschiede in den CO-Differenzspektren auf, wie die unterschiedlichen Maxima beweisen.
Es wurden für die Lage der Maxima folgende Werte ermittelt:

P450 Ia : 451,0 nm
P450 Ib : 449,5 nm

Die Fraktionen von P450 Ib, bei denen $E_{416}$ größer als 0,1 war, wurden vereinigt und nach einer Dialyse auf eine Hydroxylapatit-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte, wie in Abbildung 23 dargestellt, durch Steigerung der Phosphatkonzentration.

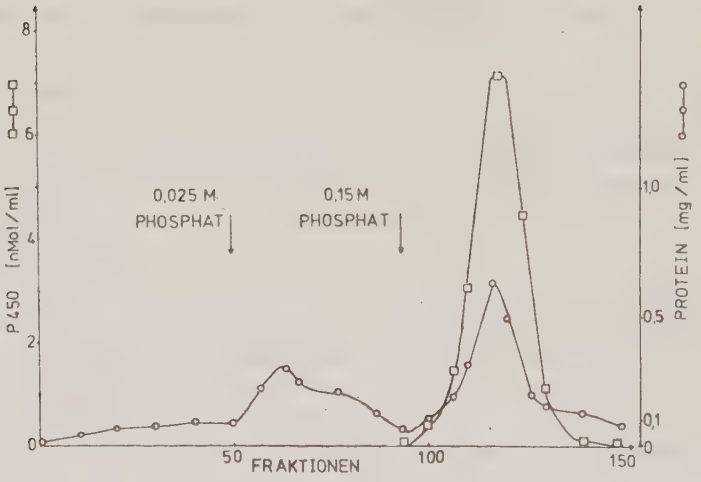



Abb. 23
Fraktionierung von P450 Ib an Hydroxylapatit.

Nach Absenkung der Renexkonzentration durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 bleibt eine Ausbeute von 184 nMol, das sind, bezogen auf die Ausgangsmenge in der Mikrosomenfraktion 3,8 %.
Die isolierte Fraktion enthält weder Cytochrom $b_5$ noch eine der beiden Reduktasen. Die übrigen Enzyme des Monooxygenasesystems sind von P450 Ib vollständig abgetrennt worden.

Tabelle 10 zeigt das Reinigungsschema für P450 I.

| Reinigungsschritt | Protein (mg) | P-450 (nMol) | spez.Konzentr. (nMol/mg) | Anreicherung | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Mikrosomen | 15.400 | 4.852 | 0,32 | - | 100 |
| sol.Mikrosomen | 11.614 | 4.486 | 0,39 | 1,2 | 92,4 |
| PEG 6 - 15 % | 5.512 | 3.978 | 0,71 | 2,2 | 81,1 |
| DEAE-Sephadex | 1.030 | 1.427 | 1,37 | 4,3 | 29,2 |
| Einengung an Calciumphosphatgel | 816 | 1.278 | 1,56 | 4,9 | 26,3 |
| 1.Anilin-Sepharose | 304 | 968 | 3,18 | 9,9 | 19,9 |
| 2.Anilin-Sepharose | | | | | |
| P 450 Ia | 36,2 | 58 | 1,60 | 5,0 | 0,7 |
| P 450 Ib | 37,8 | 264 | 6,98 | 21,8 | 5,4 |
| Hydroxylapatit | 17,2 | 210 | 12,20 | 38,1 | 4,3 |
| Sephadex LH-20 | 14,4 | 184 | 12,77 | 39,9 | 3,8 |

Tab. 10
Reinigungsschema für P450 I

Abb. 24
SDS-Gelelektrophorese von P450 Ib

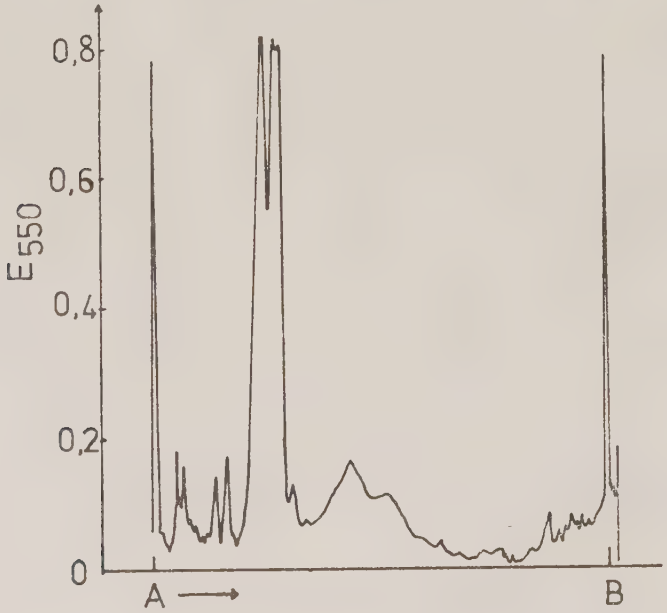



Abb. 25
Elektropherogramm von P450 Ib.
A = Gelanfang, B = Gelende. Der Pfeil kennzeichnet die Wanderungsrichtung

Die SDS-Gelelektrophorese von P450 Ib, Abbildung 24, zeigt zwei starke Banden, die dicht zusammenliegen. Bei genauer Betrachtung sieht man, daß die schneller wandernde dieser beiden Banden noch einmal unterteilt ist. Deutlicher als auf der Photographie ist das beim Pherogramm zu erkennen, Abbildung 25.
Neben diesen starken Banden erkennt man noch mehrere schwache Verunreinigungen.

Die Spektren der isolierten P450 Ib-Fraktion sind in Abbildung 26 abgebildet.
Das oxidierte Cytochrom zeigt Maxima bei 415, 524 und 560 nm, das reduzierte bei 406 und 543 nm. Das CO-Differenzspektrum weist ein Maximum bei 449,5 nm auf.

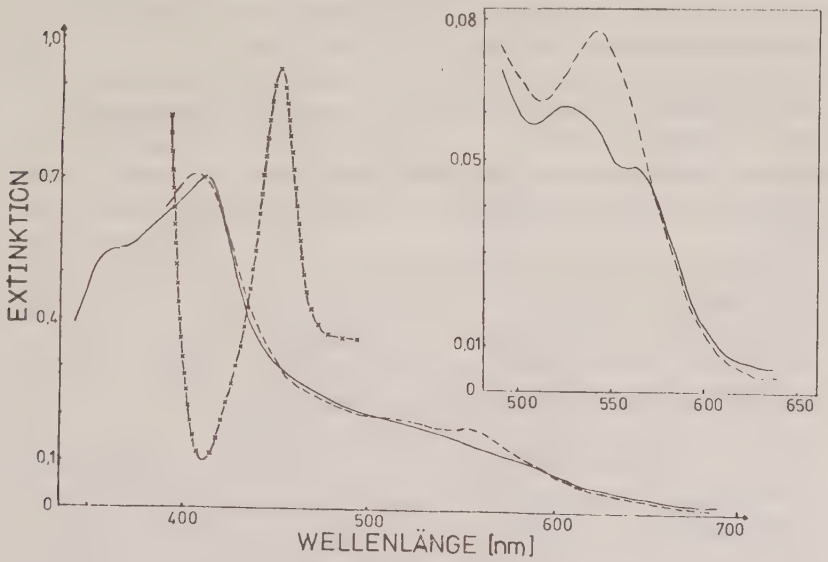



Abb. 26

Spektren von P450 Ib.
———— oxidiertes P450 Ib
– – – – durch Zugabe von Dithionit reduziertes P450 Ib
x-x-x-x CO-Differenzspektrum von P450 Ib

III.5. Reinigung von P450 III

P450 III wird zusammen mit $b_5$ und der $b_5$-Reduktase bei einer 0,12 M KCl-Konzentration von der DEAE gelöst.

Ein Einfrieren dieser Enzymfraktion für mehrere Tage, bis zur Beendigung der Reinigung von P450 I, hat sich nicht bewährt, da wegen der geringen Stabilität des Cytochroms immer beträchtliche Verluste an P450 in Kauf genommen werden mußten. Daher war es notwendig, die Aufarbeitungen der beiden P450-Fraktionen gleichzeitig durchzuführen.

Wie schon bei der Reinigung von P450 I wurde auch bei der von P450 III nach der Ionenaustauschchromatographie eine Einengung an Calciumphosphatgel vorgenommen. Auch hier zeigte sich dieses Verfahren anderen Methoden wie PEG- und Ammonsulfatfällungen überlegen.
Die eingeengte Fraktion wurde nach Dialyse durch Chromatographie an Anilin-Sepharose weiteraufgetrennt. Wie Abbildung 27 zeigt, eluieren P 450 III und die $b_5$-Reduktase bei niedrigen Ionenstärken in Gegenwart von Cholat und Renex, während $b_5$ durch einen KCl-Gradienten vom Adsorbens gelöst wird.

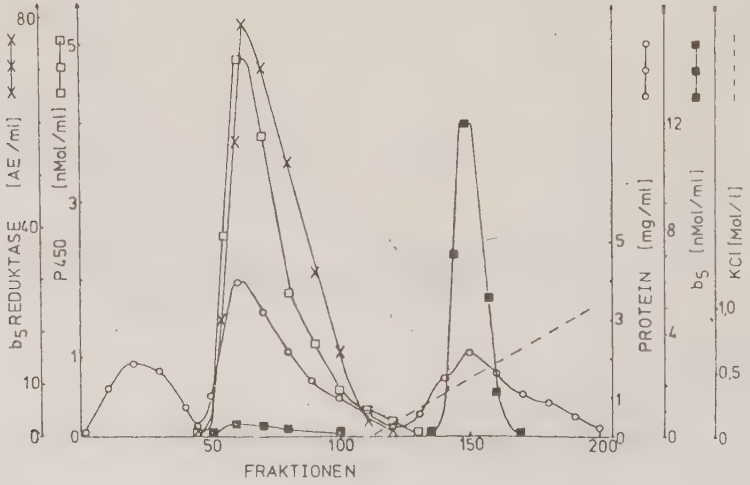



Abb. 27

Fraktionierung der eingeengten P 450 III-Fraktion an Anilin-Sepharose

Bei dieser Elutionsfolge bleibt P450 III noch mit geringen Mengen von $b_5$ verunreinigt.
Daher wurde auch die umgekehrte Elution versucht, bei der zunächst $b_5$ durch einen KCl-Gradienten eluiert wurde.
P 450 III und die $b_5$-Reduktase bleiben dabei am Gel gebunden und werden anschließend bei niedrigen Ionenstärken mit Renex und Cholat abgelöst. Bei dieser Arbeitsweise sind zwar die Verunreinigungen von $b_5$ in der P450-Fraktion geringer, dafür liegen die P450-Ausbeuten wesentlich tiefer.
Auch bei dieser Chromatographie erweist sich wieder ein möglichst schnelles Arbeiten wegen der geringen Stabilität von P450 als nötig.
Aus dem gleichen Grunde wurde auch die stufenförmige Elution von P450 der Gradientenelution vorgezogen.

Die Fraktionen mit $b_5$-Reduktase und P450 III wurden vereinigt und ohne weitere Vorbehandlung sofort auf eine Hydroxylapatitsäule gegeben. An diesem Adsorbens wird die Reduktase vom Cytochrom abgetrennt, wie im Elutionsdiagramm, Abbildung 28, zu sehen ist.
Die $b_5$-Reduktase wird durch einen Phosphatgradienten abgelöst. Das Peakmaximum befindet sich dabei bei einer 0,03 M Phosphatkonzentration.
Zur Ablösung von P450 wurde die Phosphatkonzentration stufenförmig auf 0,15 M erhöht. Auch hier ist diese Elutionsweise der Gradientenelution überlegen, da die Chromatographie dann schneller und mit höheren Ausbeuten durchgeführt werden kann.
Bei dieser Chromatographie wurde die $b_5$-Reduktase vollständig vom Cytochrom P450 abgetrennt. Reste von Cytochrom $b_5$, die wegen der unvollständigen Trennung an Anilin-Sepharose in der P450- Fraktion verblieben sind, werden auch an Hydroxylapatit nicht entfernt. Die Abtrennung wurde bei der folgenden Chromatographie an Laurat-Sepharose vorgenommen, Abbildung 29.
P450 eluiert dabei nach Senkung der Phosphat- und Erhöhung der Detergentienkonzentration, während die Verunreinigungen von $b_5$ in Gegenwart von 1 M KCl abgelöst werden.

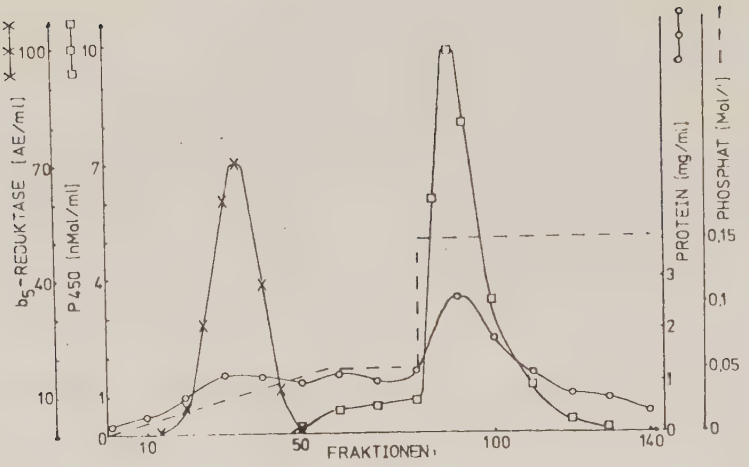



Abb. 28
Abtrennung von $b_5$-Reduktase an Hydroxylapatit

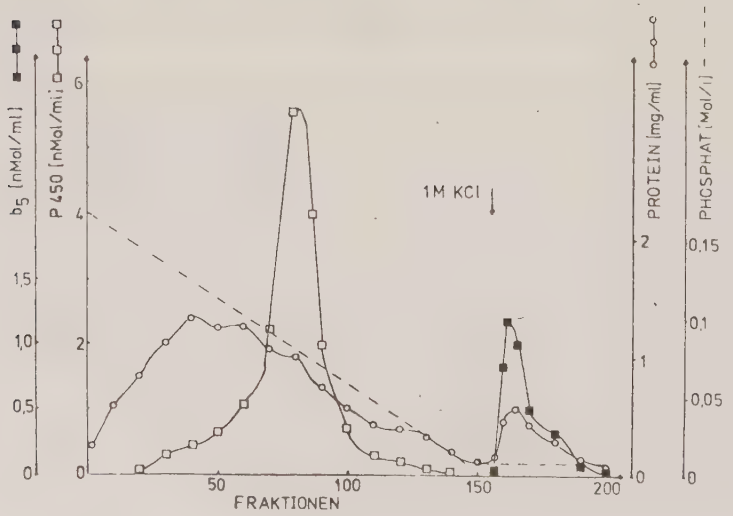



Abb. 29
Fraktionierung an Laurat-Sepharose

P450 III wurde dann abschließend noch einmal an Anilin-Sepharose chromatographographiert und mit abfallenden Ammonsulfatkonzentrationen eluiert.
Im Unterschied zu P450 I das unter gleichen Bedingungen fraktioniert wurde, zeigt P450 III bei diesem Trennungsschritt keine weitere Auftrennung in verschiedene Fraktionen, wie das Elutionsdiagramm in Abbildung 30 zeigt.

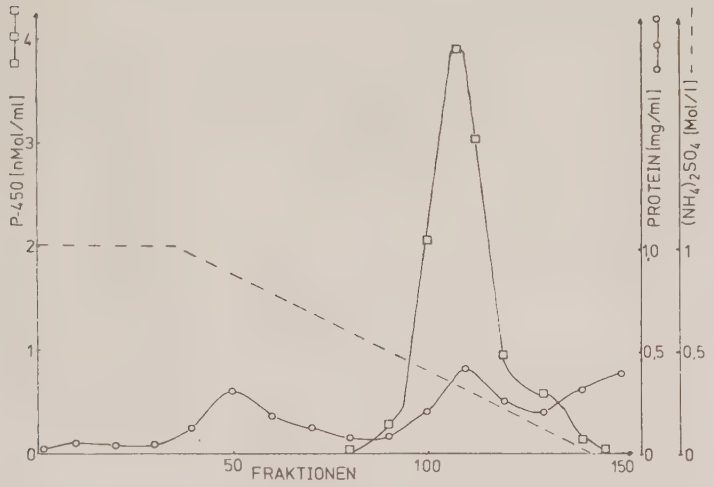



Abb. 30
Fraktionierung von P450 III an Anilin-Sepharose

Wie das Reinigungsschema für P450 III in Tabelle 11 zeigt, enthält die isolierte Fraktion 172 nMol P450.
Dies entspricht, bezogen auf die P450-Ausgangsmenge in der Mikrosomenfraktion, einer Ausbeute von 3,5 %. Die spezifische P450-Konzentration beträgt 14,09 nMol P450 pro mg Protein.

| Reinigungsschritt | Protein (mg) | P-450 (nMol) | spez.Konzentr. (nMol/mg) | Anreicherung | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Mikrosomen | 15.400 | 4.852 | 0,32 | - | 100 |
| sol.Mikrosomen | 11.614 | 4.486 | 0,39 | 1,2 | 92,4 |
| PEG 6 - 15 % | 5.512 | 3.978 | 0,71 | 2,2 | 81,1 |
| DEAE-Sephadex | 2.040 | 1.682 | 0,82 | 2,6 | 34,6 |
| Einengung an Calciumphosphatgel | 1.626 | 1.383 | 0,91 | 2,9 | 28,5 |
| Anilin-Sepharose | 533 | 940 | 1,76 | 5,5 | 19,4 |
| Hydroxylapatit | 231 | 811 | 3,51 | 10,9 | 16,7 |
| Laurat-Sepharose | 46,2 | 453 | 9,81 | 30,6 | 9,3 |
| Anilin-Sepharose | 20,8 | 286 | 13,75 | 42,9 | 5,8 |
| Sephadex LH-20 | 12,2 | 172 | 14,09 | 44,1 | 3,5 |

Tab. 11
Reinigungsschema für P450 III

Die isolierte Fraktion von P450 III enthält kein Cytochrom $b_5$ und keine der beiden Reduktasen. Die SDS-Gelelektrophorese, Abbildung 31 und 32, zeigt eine Bande. Geringfügige Verunreinigungen sind erst zu erkennen, wenn auf die Gele mehr als 80 µg Protein aufgetragen werden.

Abb. 31
SDS-Gelelektrophoreses von P450 III

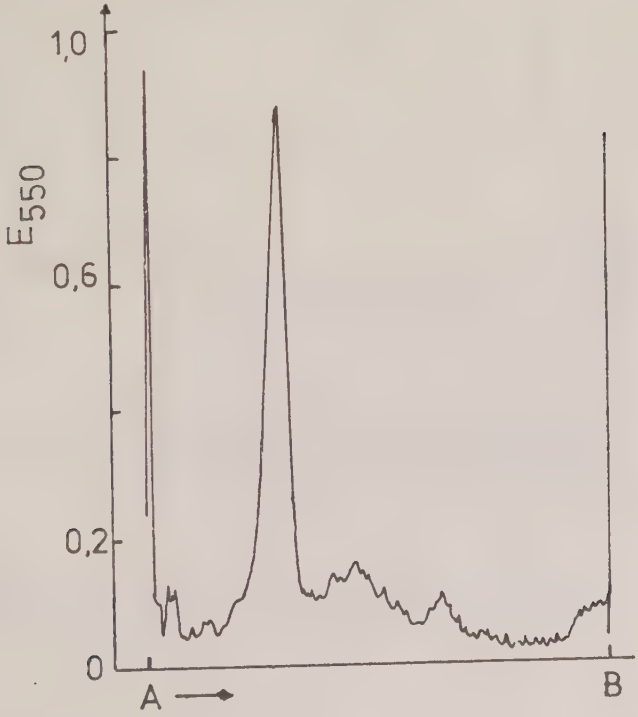



Abb. 32
Elektropherogramm von P450 III. A = Gelanfang, B = Gelende
Der Pfeil kennzeichnet die Wanderungsrichtung.

In Abbildung 33 sind die Spektren von P450 III dargestellt. Das oxidierte Cytochrom zeigt Maxima bei 414 und 529 nm. Die Maxima der reduzierten Form liegen bei 423, 527 und 556 nm. Das CO-Differenzspektrum von P450 III weist ein Maximum bei 450,5 nm auf.

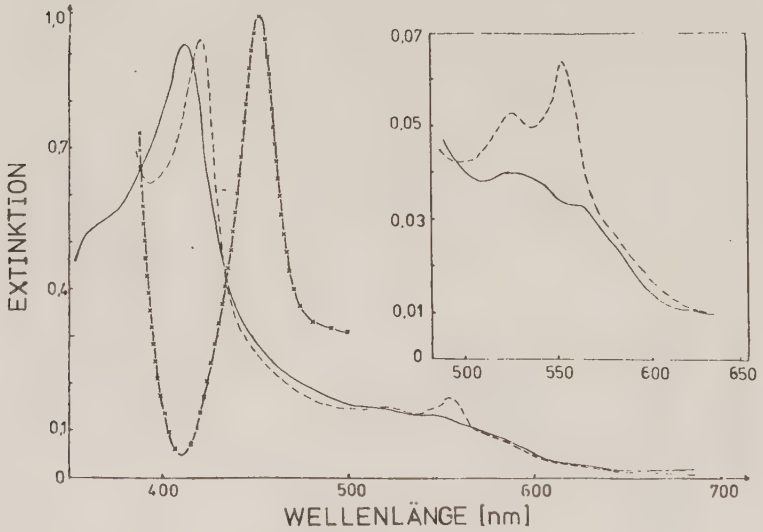



Abb. 33

Spektren von P450 III.

———— oxidiertes P450 III

– – – – durch Zugabe von Dithionit reduziertes P450 III

x-x-x-x CO-Differenzspektrum von P450 III

## III.6. Reinigung von Cytochrom $b_5$

Cytochrom $b_5$ war durch PEG-Fällungen und durch Ionenaustauschchromatographie vorgereinigt worden. An DEAE-Sephadex eluiert es zusammen mit P450 III und der $b_5$-Reduktase. Von diesen beiden Enzymfraktionen wurde $b_5$ an Anilin-Sepharose, wie das Elutionsdiagramm in Abbildung 27 zeigt, abgetrennt.

Die weitere Reinigung des Cytochroms erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Strittmatter et al. (77) durch eine zweite Ionenaustauschchromatographie, Abbildung 34, und eine Gelfiltration, Abbildung 35.

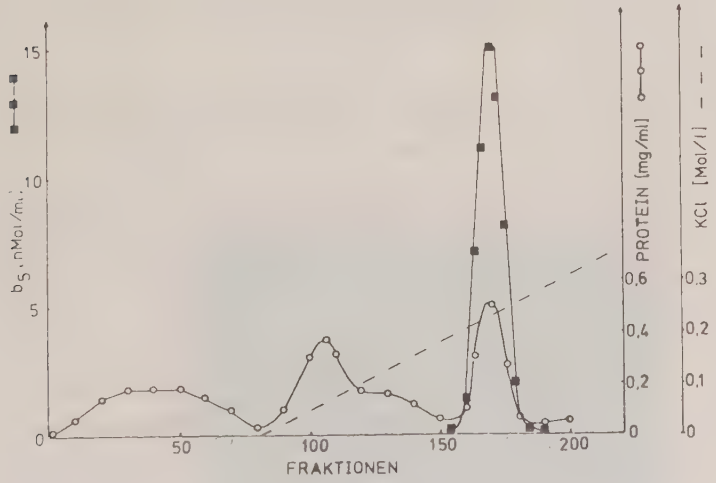



Abb. 34
Fraktionierung der von P450 III an Anilin-Sepharose abgetrennten $b_5$-Fraktion an DEAE Sepharose CL-6B.

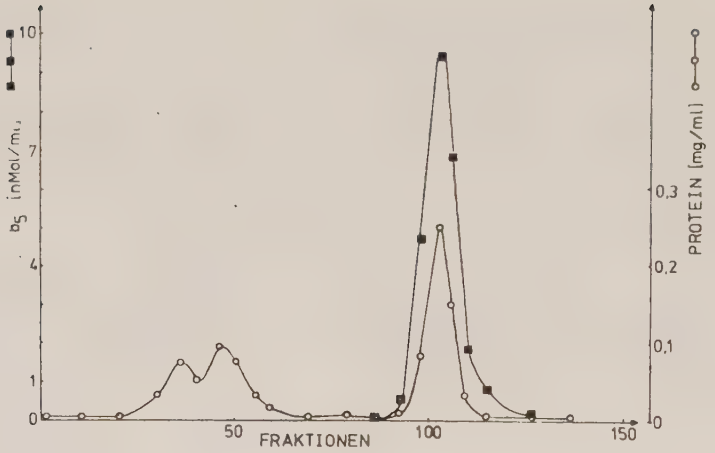



Abb. 35
Gelfiltration von Cytochrom $b_5$ an Sephacryl S 200 Superfine.

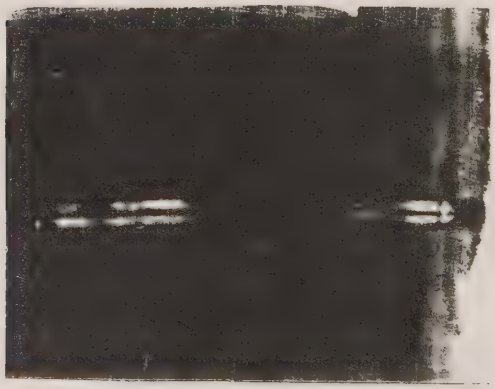


Abb. 36
SDS-Gelelektrophorese von Cytochrom $b_5$.

| Reinigungsschritt | Protein (mg) | $b_5$ (nMol) | spez.Konzentr. (nMol/mg) | Anreicherung | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Mikrosomen | 15.400 | 4.032 | 0,26 | - | 100 |
| sol. Mikrosomen | 11.614 | 2.498 | 0,21 | - | 61,9 |
| PEG 6 - 15 % | 5.512 | 2.270 | 0,41 | 1,6 | 56,3 |
| DEAE-Sephadex | 2.040 | 2.011 | 0,98 | 3,8 | 49,9 |
| Einengung an Calciumphosphatgel | 1.626 | 1.870 | 1,15 | 4,4 | 46,3 |
| Anilin-Sepharose | 159 | 1.023 | 6,43 | 24,7 | 25,3 |
| DEAE-Sepharose | 24,5 | 668 | 27,22 | 104,6 | 17,0 |
| Sephacryl S 200 | 11,4 | 496 | 38,40 | 147,7 | 10,8 |

Tab. 12
Reinigungsschema für Cytochrom $b_5$.

Tabelle 12 zeigt das Reinigungsschema für Cytochrom $b_5$. Die spezifische Konzentration des isolierten $b_5$ beträgt nach einer 147fachen Anreicherung 38,4. Es wurde eine Ausbeute von 496 nMol gewonnen. Das sind, bezogen auf die $b_5$-Ausgangsmenge in der Mikrosomenfraktion, 10,8 %.

In Abbildung 36 ist eine SDS-Gelelektrophorese des isolierten Cytochrom $b_5$ gezeigt. Das Protein hat einen hohen Reinheitsgrad. Selbst wenn größere Proteinmengen auf die Gele aufgetragen werden, sind keine Verunreinigungen zu erkennen.

Die Spektren des isolierten $b_5$ sind in Abbildung 37 dargestellt. Das oxidierte Cytochrom hat seine Soret-Bande bei 413 nm. Im reduzierten Zustand wird diese zum Langwelligen hin verschoben, mit einem Maximum bei 423 nm. Der Quotient der beiden Maxima beträgt 1,33.

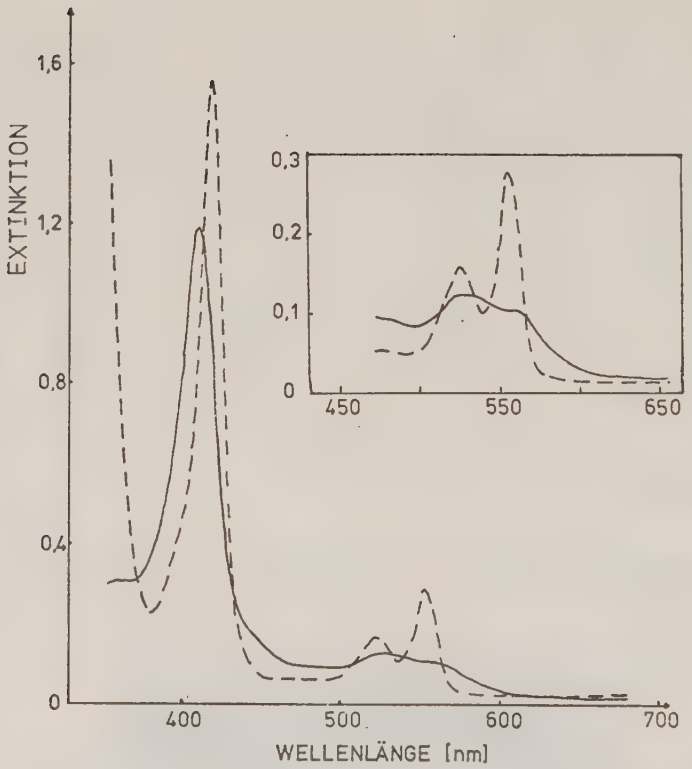



Abb. 37

Spektren des isolierten Cytochrom $b_5$.
——— oxidiertes Cytochrom $b_5$
– – – – durch Zugabe von Dithionit reduziertes Cytochrom $b_5$

## III.7. Reinigung der $b_5$-Reduktase

Die $b_5$-Reduktase wurde bei der Auftrennung der Enzyme des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenasesystems an DEAE-Sephadex zusammen mit P450 III und $b_5$ in einer Fraktion gewonnen. Nach Entfernung von $b_5$ an Anilin-Sepharose wurden P450 III und die $b_5$-Reduktase an Hydroxylapatit voneinander getrennt.

Die weitere Reinigung der Reduktase erfolgte an Blue Sepharose CL-6B und an Sephacryl S 200 Superfine.
Ein Elutionsdiagramm der Chromatographie von $b_5$-Reduktase an Blue Sepharose zeigt Abbildung 38.

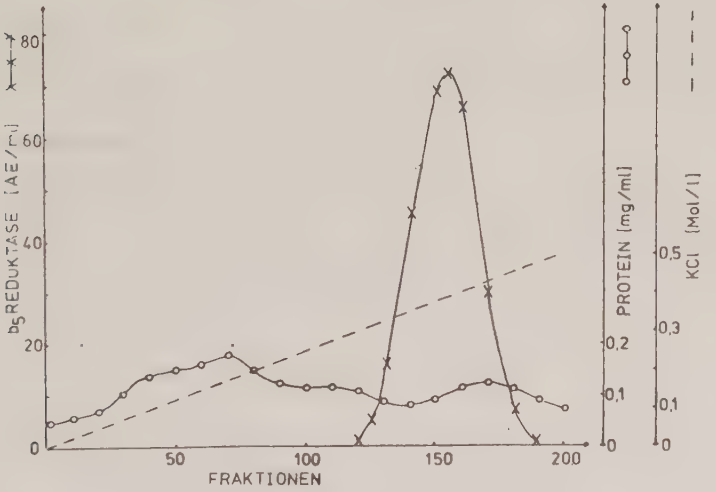



Abb. 38
Fraktionierung der an Hydroxylapatit von P450 III abgetrennten $b_5$-Reduktase an Blue Sepharose CL-6B.

Blue Sepharose ist ein erprobtes Affinitätsgel für NADH-spezifische Enzyme. Auch bei der $b_5$-Reduktase erweist sich dieses Adsorbens als sehr leistungsfähig und erbringt eine fünf- bis sechsfache Anreicherung. Eine spezifische Elution der Reduktase mit $NAD^+$ konnte aber nicht erreicht werden. Selbst bei Verwendung von Elutionspuffern, die $NAD^+$ in einer 5 mM Konzentration enthalten, blieb das Enzym fest an das Gel gebunden. Eine Ablösung des Enzyms war aber möglich durch hohe Konzentrationen von Detergentien, je 2 % Desoxycholat, Renex 690 oder Triton X-100, oder durch Steigerung der Ionenstärke mit Hilfe von KCl in Gegenwart von 0,1 % Renex. Daraus wird ersichtlich, daß es sich hier nicht um eine reine Affinitätschromatographie handeln kann, sondern daß hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Reduktase und dem am Gel gebundenem Liganden, Cibacronblau F3G-A, zur Bindung des Enzyms einen großen Beitrag leisten.
Enthält die auf das Affinitätsgel aufgetragene Reduktasefraktion wegen einer unvollständigen Trennung an Hydroxylapatit noch P450 III , so beobachtet man, daß das Cytochrom keineswegs, wie man es erwarten sollte, im Leervolumen vom Affinitätsgel eluiert wird. Ganz im Gegenteil erweist sich das Cytochrom wesentlich fester an die Blue Sepharose gebunden als die $b_5$-Reduktase und kann erst durch hohe Detergentienkonzentrationen abgelöst werden. Es gelang aber nicht,diese feste Bindung zwischen P450 III und dem Affinitätsgel für einen Reinigungsschritt zu nutzen, da das Cytochrom sich an diesem Adsorbens als sehr instabil erwies.
Statt Chromatographien an Blue Sepharose wurden auch Fraktionierungen an Cibacronblau F3G-A, gekoppelt an Sephadex G-75, durchgeführt. Die Kopplung des Liganden an die Gelmatrix erfolgte nach einer Vorschrift von Böhme et al. (78). Dieses Verfahren ermöglicht eine billige Herstellung großer Mengen des Affinitätsgels. Das selbst hergestellte Gel erwies sich als nicht so brauchbar wie die Blue Sepharose, da die $b_5$-Reduktase nicht sehr fest gebunden wurde, so daß die erzielten Anreicherungen weniger groß waren. Auch bei diesem Adsorbens konnte keine biospezifische Elution der Reduktase mit $NAD^+$

erreicht werden.
Zum Abschluß der Reinigung wurden letzte Verunreinigungen von der $b_5$-Reduktase in einer Gelfiltration an Sephacryl S 200 Superfine abgetrennt.
Die Reduktase erwies sich nach einer 217fachen Anreicherung bei einer spezifischen Aktivität von 1174 AE/mg in der SDS-Gelelektrophorese, Abbildung 39, als rein.

| Reinigungsschritt | Protein (mg) | Aktivität (AE) | spez.Akt. (AE/mg) | Anreicherung | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Mikrosomen | 15.400 | 82.427 | 5,4 | - | 100 |
| sol.Mikrosomen | 11.614 | 80.323 | 6,9 | 1,3 | 97,4 |
| PEG 6 - 15 % | 5.512 | 70.660 | 12,8 | 2,4 | 85,7 |
| DEAE-Sephadex | 2.040 | 39.480 | 19,4 | 3,6 | 47,8 |
| Einengung an Calciumphosphatgel | 1.626 | 33.771 | 20,8 | 3,8 | 40,9 |
| Anilin-Sepharose | 533 | 24.732 | 46,4 | 8,6 | 30,0 |
| Hydroxylapatit | 115 | 19.805 | 172,2 | 31,9 | 24,0 |
| Blue Sepharose | 12,5 | 11.394 | 911,5 | 168,8 | 13,8 |
| Sephacryl S 200 | 5,0 | 5.872 | 1174,4 | 217,4 | 7,1 |

Tab. 13
Reinigungsschema für die $b_5$-Reduktase

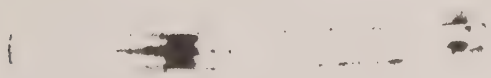


Abb. 39
SDS-Gelelektrophorese der isolierten $b_5$-Reduktase

Das Spektrum der isolierten $b_5$-Reduktase zeigt Maxima bei 390 und 462 nm mit einer starken Schulter bei 500 nm und zwei weniger ausgeprägten Schultern bei 440 und 375 nm. Anders als bei der P-450-Reduktase zeigt hier bei der $b_5$-Reduktase der langwellige Flavinpeak eine niedrigere Extinktion als der kurzwellige.
Das gezeigte Spektrum stimmt in den aufgeführten Eigenschaften mit den bei Iyanagi (80) gezeigten Spektren überein.
Im Gegensatz zur P-450 Reduktase bildet die $b_5$-Reduktase unter aeroben Bedingungen kein Semichinon.

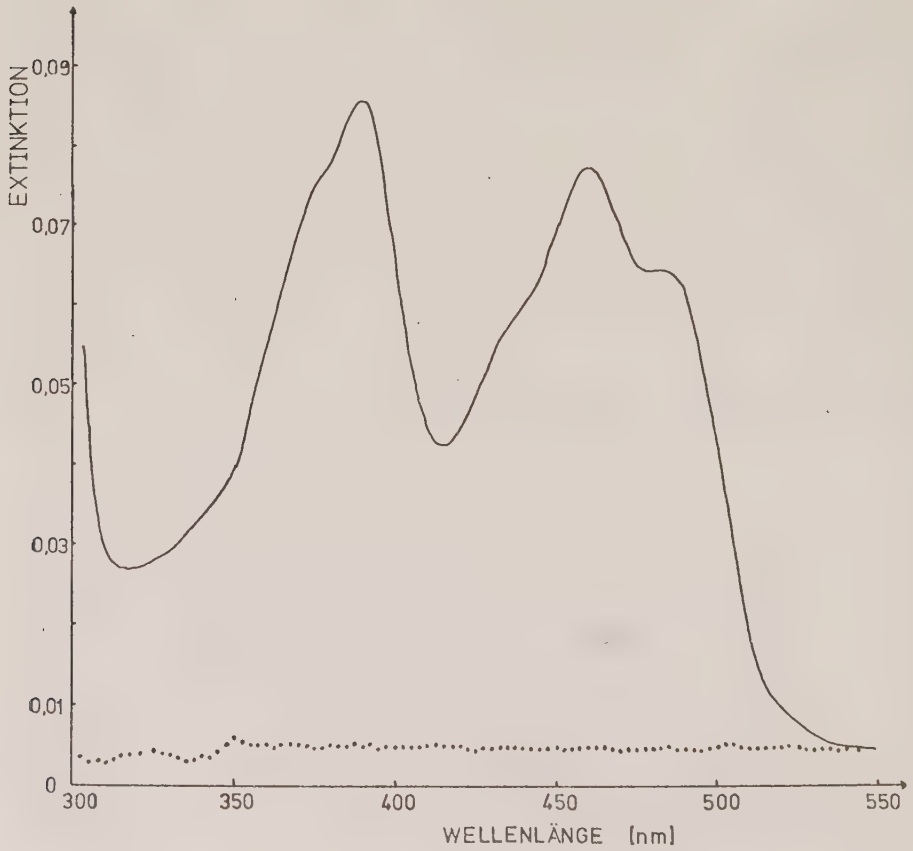



Abb. 40
Spektrum der isolierten Cytochrom $b_5$-Reduktase.
——— oxidiertes Enzym
····· Photometergrundlinie

III.8. Reinigung der P450-Reduktase

An Sephadex-DEAE wurde die P450 Reduktase von den übrigen Enzymen des Monooxygenasesystems abgetrennt.
Die weitere Reinigung der Reduktase erfolgt wie in Abschnitt III.2.3. beschrieben durch Chromatographien an Hydroxylapatit, ADP-Sepharose und Ultrogel AcA 34.

| Reinigungsschritt | Protein (mg) | Aktivität (AE) | spez.Akt. (AE/mg) | Anreicherung | Ausbeute (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Mikrosomen | 15.400 | 714 | 0,05 | - | 100 |
| sol.Mikrosomen | 11.614 | 688 | 0,06 | 1,2 | 96,3 |
| PEG 6 - 15 % | 5.512 | 614 | 0,11 | 2,2 | 89,2 |
| DEAE-Sephadex | 1.327 | 486 | 0,33 | 7,2 | 68,0 |
| Hydroxylapatit | 293 | 352 | 1,20 | 24,0 | 49,3 |
| ADP-Sepharose | 5,9 | 233 | 39,50 | 789,9 | 32,6 |
| Ultrogel AcA 34 | 4,5 | 178 | 39,55 | 791,1 | 24,9 |

Tab. 14
Anreicherungsschema für die P450-Reduktase

III.9. Zusammenschau der Reinigungen

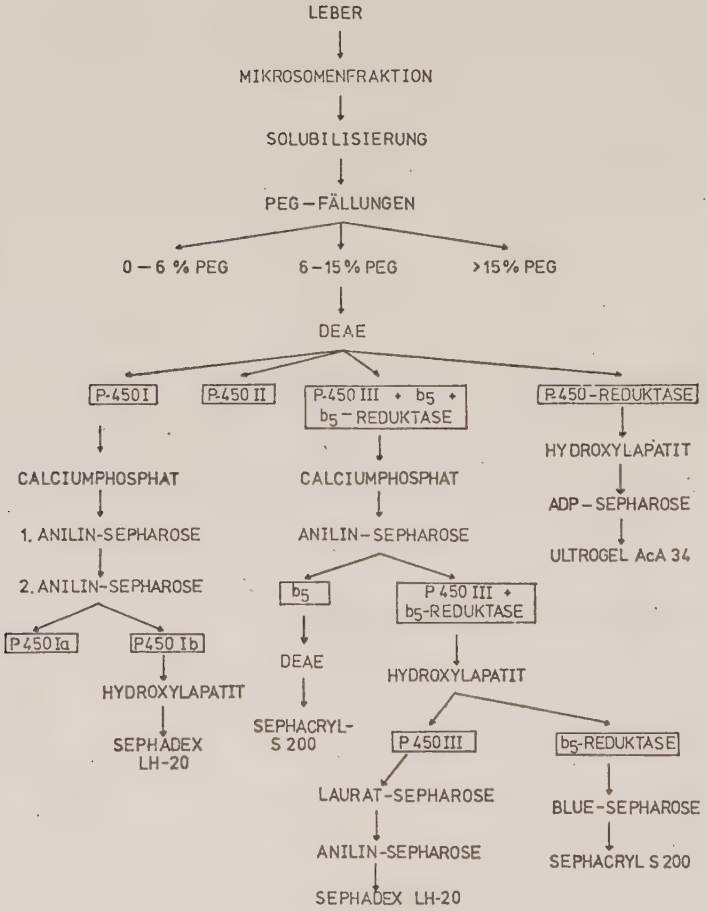



Abb. 41
Erarbeitetes Reinigungsschema

| Enzym | Ausbeute (mg) | (nMol) (AE) | (%) | spez.Akt. (nMol/mg) (AE/mg) | Anreicherung |
|---|---|---|---|---|---|
| P450 Ib | 14,4 | 184 | 3,8 | 12,77 | 39,9 |
| P450 III | 12,2 | 172 | 3,5 | 14,09 | 44,1 |
| P450 II | | 183 | 3,8 | 1,18 | 3,8 |
| P450 Ia | | 58 | 0,7 | 1,60 | 5,0 |
| $b_5$ | 11,4 | 496 | 10,8 | 38,40 | 147,7 |
| $b_5$-Reduktase | 5,0 | 5872 | 7,1 | 1174,4 | 217,4 |
| P450-Reduktase | 4,5 | 178 | 24,9 | 39,55 | 791,1 |

Tab. 15
Zusammenfassung der Reinigungsschemata

Die Enzyme des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenasesystems wurden gleichzeitig aus einer Schweineleber isoliert.
Dazu wurde eine neue Methodik entwickelt, die in Abbildung 41 in Form eines Reinigungsschemas dargestellt ist.
In der Literatur ist eine derartige Isolierung bisher nicht bekannt geworden.
Cytochrom P450 wurde in vier verschiedene Fraktionen aufgetrennt, P450 Ia, P450 Ib, P450 II und P450 III. Zwei dieser Fraktionen, P450 Ib und P450 III, konnten in einem hohen Reinheitsgrad isoliert werden.
Eine Zusammenfassung der Reinigungsergebnisse ist in Tabelle 15 enthalten.

## IV. Diskussion

Diese Arbeit ist ein Teilprojekt innerhalb einer Arbeitsgruppe, die sich mit der Wirkungsweise des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenasesystems beschäftigt. Als Modellsubstrat wird dabei Tetrachlorkohlenstoff verwendet. $CCl_4$ ist eine Verbindung von hoher Lebertoxizität und die Entfaltung der toxischen Wirkung ist gebunden an die vorherige Umsetzung von $CCl_4$ durch das Monooxygenasesystem. An der Schägigung sind mehrere, sowohl sauerstoffabhängige als auch sauerstoffunabhängige,Mechanismen beteiligt (82).

Der Untersuchung dieser Vorgänge im Tierexperiment und durch Versuche mit Mikrosomensystemen sind durch die biologische Streuung und die Komplexität des Systems Grenzen gesetzt. Voraussetzung für eine erfolgreiche Untersuchung der im Molekularbereich ablaufenden Vorgänge ist eine möglichst weitgehende Vereinfachung des Untersuchungssystems. Ideales Objekt für solche Experimente ist daher ein rekonstituiertes System, das aus den gereinigten Proteinen zusammengesetzt ist, die an den Reaktionsabläufen beteiligt sind.
Damit dieses rekonstituierte System möglichst nahe an die physiologischen Gegebenheiten im Organismus heranreicht, müssen neben einem hohen Reinheitsgrad der isolierten Proteine zwei weitere Bedingungen erfüllt werden.
Das System soll alle Proteine enthalten, die in vivo am Aufbau des Fremdstoffmonooxygenasesystems beteiligt sind. Dazu gehören, wie Abbildung 1 zeigt, das Cytochrom P450 und die Proteine, die an dessen Reduktion beteiligt sind: die Cytochrom P450-Reduktase, Cytochrom $b_5$ und die $b_5$-Reduktase. Die zweite zu erfüllende Bedingung besteht darin, daß die isolierten Proteine in geeigneten Mengenverhältnissen in definierte Membranvesikel eingebaut werden, so daß sie sich in einem Milieu befinden, das dem Endoplasmatischen Reticulum entspricht.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine Methodik für die Isolierung der Enzyme des mikrosomalen Fremdstoffmonooxygenase-systems zu erarbeiten und damit die Grundvoraussetzung für die Erstellung eines rekonstituierten Systems zu schaffen.
Als Versuchstiere dazu boten sich vor allem Ratten und Kaninchen an, denn diese beiden Organismen waren bis dahin die einzigen, aus denen eine erfolgreiche Isolierung von P450 gelungen war (22,23,24,25). Da die übrigen Experimente innerhalb der Arbeitsgruppe an Ratten als Versuchstieren bzw. an Rattenlebermikrosomen ausgeführt wurden, erschien es sinnvoll, Rattenleber als Ausgangsmaterial für die Isolierungen zu benutzen.
Die angestrebte Isolierung von vier verschiedenen Enzymen aus einem Ausgangsmaterial ist ein schwieriges Projekt, besonders da es sich um membrangebundene Enzyme handelt, deren Isolierung in der Regel experimentell aufwendiger ist als die Isolierung von cytoplasmatischen Proteinen.
In der Literatur findet man zwar die Isolierung von allen vier Enzymen beschrieben, doch handelt es sich dabei meist um Einzelisolierungen oder von Isolierungen von P450 und der P450-Reduktase. Eine Methodik zur Präparation aller vier Enzyme ist bisher nicht entwickelt worden.
Als Einstieg in die Arbeit wurde die Isolierung der P450-Reduktase gewählt, da die Präparation dieses Enzyms wegen der Möglichkeit, eine Affinitätschromatographie einzusetzen, am leichtesten schien. Dabei sollten einerseits Erfahrungen im Umgang mit Membranenzymen gesammelt werden und andererseits sollte bei allen erforderlichen Arbeitsgängen das chromatographische Verhalten auch der übrigen zu isolierenden Proteine mitbeobachtet werden, um für deren nachfolgende Isolierung Anhaltspunkte zu gewinnen.
Tatsächlich erwies sich die Aufarbeitung der P450-Reduktase aus Rattenleber als unproblematisch. Schon im ersten Anlauf

gelang mit einer Ausbeute von nahezu 31 % an reiner Reduktase ein gutes Ergebis. Zusätzlich wurde am DEAE-Ionenaustauscher eine brauchbare Auftrennung der übrigen Enzyme des Monooxygenasesystems beobachtet, die in den folgenden Isolierungen nutzbar gemacht werden sollte.
Die erzielte Ausbeute von 31 % kann als gut bezeichnet werden und ist sicher nicht mehr wesentlich steigerungsfähig. Betrachtet man jedoch nicht die prozentuale Enzymausbeute, sondern die isolierte Menge, so sieht man, daß die hohe Ausbeute tatsächlich nur 0,7 mg Protein ausmacht, eine Menge, die für Rekonstitutionszwecke völlig unzureichend ist. Ausgangsmaterial dieser Isolierung waren 10 Rattenlebern und selbst eine Verdopplung oder Verdreifachung des Ansatzes führt zu keiner Lösung dieses Problems.
Dabei ist noch anzumerken, daß die Lebern von mit Phenobarbital induzierten Ratten genommen wurden, so daß eine weitere Steigerung der Reduktaseaktivität im Ausgangsmaterial nicht möglich ist.
Um also eine Reduktasemenge von 10 mg zu erhalten, muß man, eine gleichbleibende Ausbeute vorausgesetzt, die Lebern von etwa 140 Ratten aufarbeiten. Eine ähnliche Rechnung läßt sich auch für das P450 aufmachen. Zwar enthält das Endoplasmatische Retikulum mehr P450 als P450-Reduktase, aber die bei der Reingung zu erwartenden Ausbeuten sind für das Cytochrom bedeutend niedriger anzusetzen. Ryan, Lu und Levin (74), die Isolierungen von P450 sowohl aus mit Phenobarbital als auch aus mit 3-Methylcholanthren induzierten Ratten durchgeführt haben, gewinnen dabei Ausbeuten von nur 1,3 bzw. 1,4 %. Setzt man gleiche Ausbeuten voraus, dann errechnet sich daraus bei einer P450-Ausgangsmenge in der Mikrosomenfraktion von 943 nMol, Tabelle 1, eine Ausbeute von 12 nMol P450. Die Arbeitsgruppe von Ryan, Lu und Levin kann auf dem Gebiet der P450-Isolierungen aus Rattenleber als führend angesehen werden und verfügt bei diesen Arbeiten

über mehrjährige Erfahrungen. Realistisch ist daher die Annahme, daß die Ausbeuten dieser Gruppe nicht so schnell zu erreichen sein werden, so daß die tatsächlich zu erwartenden Ausbeuten noch niedriger anzusetzen sind.

Rattenlebermikrosomen stellen für das angestrebte Ziel ein wenig geeignetes Ausgangsmaterial dar, da daraus die zu isolierenden Enzyme bei vertretbarem Aufwand nur in geringen Mengen erhältlich sind. Die Isolierungsarbeiten an der Rattenleber wurden daher nicht weiterfortgesetzt.

Als neues Ausgangsmaterial wurde Schweineleber gewählt. Diese bietet den Vorteil, daß sie billig und in großen Mengen vom Schlachthof bezogen werden kann. Ein Nachteil ist aber, daß bisher noch keine Isolierung von P450 aus Schweineleber beschrieben wurde, so daß keine Literaturvorschrift zur Präparation herangezogen werden konnte. Die Größe der Leber, eine Schweineleber wiegt etwa 1,5 kg, erlaubt es sogar, auf eine vorherige Induktion der Tiere zu verzichten und eine Isolierung von P450 aus einem nicht vorbehandelten Schwein vorzunehmen.
Die überwiegende Zahl der bisher beschriebenen P450-Isolierungen gehen aus von induzierten Organismen und es existieren bislang nur zwei Arbeiten, die P450-Anreicherungen aus den Lebern von nicht vorbehandelten Ratten (59) bzw. Kaninchen (58) beschreiben.
Der Grund für die Wahl von vorbehandelten Tieren als Ausgangsmaterial von Isolierungen liegt in der Schwierigkeit der P450-Aufarbeitung, die sehr arbeitsaufwendig ist und dabei nur geringe Ausbeuten erbringt. Daher werden vor der Isolierung massive Vorbehandlungen mit Verbindungen durchgeführt, die P450 induzieren, wie Phenobarbital und 3-Methylcholanthren. Dadurch kann der P450-Gehalt der Lebermikrosomen mehr als verdoppelt werden.
Diese Steigerung der P450-Ausgangsmenge ist ein unbestreitbarer Vorteil. Gleichzeitig nimmt man durch die Vorbehandlung einen großen Nachteil in Kauf. Durch die Vorbehandlung

wird nämlich nicht nur die Quantität sondern auch die Qualität des P450 verändert.
Das Fremdstoffmonooxygenasesystem setzt eine große Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher Verbindungen oxidativ um. Neben dieser Substratvielfalt besteht eine ganze Reihe von verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten durch das System. Bekannt sind Hydroxylierungen von aliphatischen und aromatischen Verbindungen, Dealkylierungen von Heteroatomen, Epoxidierungen und Dehalogenierungen.
Diese verschiedenen Reaktivitäten werden von einer ganzen Reihe unterschiedlicher P450-Enzyme bewältigt (36).
Das in der Leber momentan vorhandene P450-Angebot wird durch die Umwelt bestimmt, in der sich ein Organismus befindet. Ein Eingriff wie die Vorbehandlung mit Pharmaka führt zu einer vollständigen Veränderung der vorhandenen P450-Spezies. 7-Äthoxycumarin zum Beispiel wird von nicht vorbehandelten Ratten gar nicht, von mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren vorbehandelten Ratten sehr schnell umgesetzt (83). Eine Gabe von Induktoren führt daher im induzierten Organismus nicht nur zu einer starken Erhöhung der P450-Menge sondern auch zu einer drastischen Verschiebung der momentan vorhandenen P450-Enzyme.
Wenn daher ein Fremdstoffmonooxygenasesystem aus gereinigten Proteinen so rekonstituiert werden soll, daß es dem physiologischen Geschehen möglichst nahe kommt, dann wird diese Nähe auch wesentlich mitbestimmt durch die Art des isolierten P450-Enzyms. Einer P450-Spezies, die aus einem nicht vorbehandelten Organismus isoliert wurde, kommt deshalb eine höhere physiologische Relevanz zu als einer Spezies, die erst nach massiver Vorbehandlung mit einem Induktor gebildet wurde.
Aus diesem Grund wurde bei den P450-Isolierungen aus der Schweineleber auf eine Induktion verzichtet. Beim Schwein ist das wegen der Lebergröße eher möglich als bei Ratten und Kaninchen, die kleinere Lebern haben und dadurch weniger P450 besitzen.

Ebenso wie bei der Ratte wurde auch bei den Enzymaufarbeitungen aus der Schweineleber mit der Isolierung der P450-Reduktase begonnen. Auch hier wurden wieder bei allen dazu erforderlichen Reinigungsschritten die anderen Enzyme mitbeobachtet, um Kenntnisse über deren chromatographisches Verhalten zu gewinnen.
Leider brachte die Enzympräparation der Reduktase aus der Schweineleber größere Schwierigkeiten mit sich als die Reinigung des homologen Enzyms aus der Rattenleber.
Diese Schwierigkeiten zeigten sich zunächst in einer größeren Instabilität des Schweineleberenzyms. Während bei der Chromatographie der solubilisierten Rattenlebermikrosomen am DEAE-Ionenaustauscher auch bei einem linearen KCl-Gradienten keine wesentlichen Enzymverluste festgestellt wurden, erwies sich eine Chromatographie der Schweinelebermikrosomen unter den gleichen Bedingungen wegen der Instabilität der Reduktase als undurchführbar.
Die Ionenaustauschchromatographie wurde daher nach der Methode von Yasukochi und Masters (44) im "batch"-Verfahren oder in einer Säulenchromatographie mit stufenförmiger Elution vorgenommen. Die Reduktase kann durch Zugabe von FMN und Glycerin zu den Elutionslösungen geringfügig stabilisiert werden. Eventuell ist eine Abspaltung des Coenzyms FMN an der Denaturierung des Enzyms beteiligt.
Neben der geringeren Stabilität zeigte es sich auch, daß zur Gewinnung von elektrophoretisch reiner Reduktase mindestens ein weiterer Reinigungsschritt mehr nötig ist als bei der Rattenleberreduktase. Dieser zusätzliche Reinigungsschritt wurde vor der Affinitätschromatographie in Form einer Fraktionierung an Hxdroxylapatit oder an ω-Aminooctyl-Sepharose durchgeführt.
Bei mehreren Isolierungen wurde nach der Affinitätschromatographie noch eine Verunreinigung der isolierten Reduktase in der SDS-Gelelektrophorese festgestellt. Diese Verunreinigung wurde besonders dann beobachtet, wenn die ersten Schritte der Aufarbeitung, Mikrosomenpräparation, Solubili-

sierung und Ionenaustauschchromatographie, nicht zügig durchgeführt werden konnten. Wurde während dieser Aufarbeitungsschritte ein Proteaseinhibitor wie p-Toluolsulfonsäurefluorid in einer 1 mM Konzentration eingesetzt, dann trat die Verunreinigung vermindert auf.
In einer neueren Arbeit weist auch Masters (84) auf diese Verunreingung hin, die sie bei der Reduktase aus der Ratten- und Kaninchenleber, besonders deutlich aber bei dem Enzym aus der Schweineleber beobachtet. Die zweite Bande in der SDS-Gelelektrophorese zeigt, wie Masters berichtet, ebenfalls Reduktaseaktivität gegenüber künstlichen Elektronenakzeptoren, wie DCPIP und Cytochrom c, erweist sich aber im rekonstituierten System gegenüber P450 als inaktiv.
Diese Proteinfraktion verhält sich also wie P450-Reduktase, die mit Hilfe von Proteasen aus der Membran abgedaut worden ist. Bei Verwendung von Leupetin und Pepstatin während der Aufarbeitung konnte Masters die Verunreinigung nicht mehr feststellen. Leupeptin und Pepstatin sind Inhibitoren lysosomaler Proteasen (85).
Daraus geht hervor, daß es sich bei der Verunreinigung wahrscheinlich um ein Proteolyseprodukt der nativen Reduktase handelt. Dies wird durch das chromatographische Verhalten dieser Proteinfraktion bestätigt, da es, wie auch die native Reduktase, an das für NADPH-Enzyme spezifische Affinitätsgel 2'5'-ADP-Sepharose gebunden wird und mit 2'-AMP spezifisch abgelöst werden kann.
Eine Abtrennung dieser Verunreingung gelingt durch Gelfiltration an Ultrogel AcA 34.
Bei der Isolierung der P450-Reduktase aus der Rattenleber wurde eine solche Verunreinigung nicht beobachtet.
Dies beruht vermutlich darauf, daß wegen der geringeren Ausgangsmenge an Rattenleber eine schnellere Aufarbeitung möglich ist als bei großen Portionen Schweineleber, so daß hier wegen der kürzeren Aufarbeitungszeit Proteolysen nicht ins Gewicht fallen.

Nach der gelungenen Präparation von P450 -Reduktase aus der Schweineleber wurde die Präparation von P450 in Angriff genommen. Dazu sollte als erstes die schon bei der Reduktasenpräparation durchgeführte Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex eingesetzt werden.
Dieses Vorhaben setzte umfangreiche Vorarbeiten voraus. Zunächst mußten für die Herauslösung von P450 aus der Membran des Endoplasmatischen Reticulums geeignete Bedingungen gefunden werden.
Bei der überwiegenden Zahl der P450-Isolierungen wird dazu das ionische Detergens Natriumcholat verwendet. Lebermikrosomen von induzierten Kaninchen solubilisieren die meisten Autoren bei einem Cholat/Protein-Verhältnis von 3/1 (23,76,86,87). Weniger Detergens verwenden Imai und Sato (22), sie solubilisieren bei einem Cholat/Protein-Verhältnis von 1,5/1.
Bei P450-Isolierungen aus Rattenleber werden geringere Cholatmengen eingesetzt. Die Solubilisierungen werden bei einem Cholat/Protein-Verhältnis von 1/1 durchgeführt.
Bei den eigenen Versuchen an Schweinelebermikrosomen wurde festgestellt, daß Cholat zur Solubilisierung nicht geeignet ist. Insbesondere bei den hohen Cholatkonzentrationen, Cholat/Protein = 3/1, wurden beim P450 starke Denaturierungen beobachtet. Bessere Ergebnisse brachten Solubilisierungen mit dem nichtionischen Detergens Renex 690. Die besten Ausbeuten an P450 wurden in Solubilisierungen bei einem Renex/Protein-Verhältnis von 1/1 erreicht.
Gibson und Schenkman (59) solubilisieren bei ihrer Anreicherung von nicht induziertem P450 aus der Rattenleber ebenfalls mit einem nichtionischen Detergens. Sie verwenden Emulgen 911 bei einem Emulgen/Protein-Verhältnis von 0,66/1.

Wird die so solubilisierte Mikrosomenfraktion an DEAE aufgetrennt, dann stellt man beim P450 starke Verluste durch Denaturierung fest. Eine direkte Auftrennung der solubilisierten

Mikrosomen an DEAE ist ohne weitere Vorbehandlung nicht durchführbar. Daher wurde vor der Ionenaustauschchromatographie eine Konzentrierung der solubilisierten Mikrosomenfraktion durch PEG-Fällungen eingeführt. Um bei diesen Fällungen ein unspezifisches Ausfallen der zu isolierenden Proteine zu vermeiden, war es nötig, vor der Fällung noch einmal Detergens zuzugeben. PEG-Fällungen sind Bestandteil mehrerer P450-Reinigungen (23,76,86,87). Bei diesen Aufarbeitungen trat das Problem des unspezifischen Ausfallens offensichtlich weniger auf, da hier schon von Beginn der Reinigung an wesentlich höhere Detergentienmengen eingesetzt wurden.
Die PEG-Fällungen in dieser Arbeit wurden so durchgeführt, daß alle zu isolierenden Proteine in einer Fraktion gewonnen wurden. Dieser Arbeitsschritt ist von den dabei erreichten Anreicherungen her gesehen unbedeutend. Wichtig ist die starke Konzentrierung und das Abtrennen von Lipiden. Erst danach ist eine erfolgreiche Durchführung der Ionenaustauschchromatographie möglich.

Die mit Renex solubilisierten und mit PEG vorbehandelten Mikrosomen werden an DEAE reproduzierbar und mit hohen Enzymausbeuten aufgetrennt. Das Fremdstoffmonooxygenasesystem wird bei dieser Chromatographie in vier Fraktionen aufgeteilt. Drei dieser Fraktionen enthalten P450. Zusätzlich zum verschiedenen chromatographischen Verhalten unterscheiden sich die drei P450-Fraktionen in ihren CO-Bindungsspektren. Rechromatographiert man die drei Fraktionen einzeln an DEAE-Sephadex, so erhält man jeweils wiederum nur einen P450-Peak. Dieser Befund bestätigt, daß es sich um drei chromatographisch unterschiedliche Fraktionen handelt. Wesentliche Voraussetzung für die Auftrennung von P450 in drei Fraktionen ist die vorausgehende PEG-Fällung, bei der Lipide abgetrennt werden. Verzichtet man auf diese Fällung, dann erhält man in Gegenwart nichtionischer Detergentien

nur einen P450-Peak (88). Verwendet man neben Renex auch Desoxycholat,wird das P450 in zwei Fraktionen aufgetrennt, Abbildung 7 und 8.
Ähnliche Beobachtungen haben auch Ryan, West, Lu und Levin (89) gemacht. Sie erhalten bei der Chromatographie von solubilisierten Rattenlebermikrosomen an DEAE in Abhängigkeit vom Lipidgehalt der Fraktion und der verwendeten Detergentien einen oder zwei P450-Peaks.

Die Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex ist der Grundstein der Enzympräparationen. Ausgehend von der hier erreichten Auftrennung werden die einzelnen Enzyme weitergereinigt.
Als besonders geeignete Fraktionierungen für P450 haben sich Chromatographien an hydrophobisierten Sepharosen erwiesen. Besonders oft angewendet werden Chromatographien an ω-Aminooctyl-Sepharose (22,25,90,91). Diese Methode wurde von Imai und Sato (22) entwickelt. Daneben haben Gibson und Schenkman (59) mit der Laurat-Sepharose ein weiteres hydrophobes Gel in P450-Präparationen eingeführt.
Bei der Isolierung von P450 aus Schweineleber in der hier vorgestellten Arbeit hat sich besonders Anilin-Sepharose bewährt. Dieses Gel ist bereits zur Isolierung von P450 (72) aus der Nebennierenrinde benutzt worden und wird hier erstmals auch für mikrosomales P450 eingesetzt.

Insgesamt ergab sich bei der Reinigung eine Auftrennung von P450 in vier Fraktionen. Zwei dieser Fraktionen, P450 Ia und P450 II, wurden wegen der geringen Ausgangsmengen nicht weiter gereinigt.
P450 III wurde bis zu einer spezifischen Aktivität von 14,09 nMol P450/mg Protein angereichert. Die SDS-Gelelektrophorese dieser Fraktion zeigt nur eine Bande. Verunreinigungen werden erst dann sichtbar, wenn mehr als 100 ug Protein auf die Gele aufgetragen werden.

Die SDS-Gelelektrophorese von P450 Ib hingegen weist drei starke dicht zusammenliegende Banden auf. Die spezifische Konzentration dieser Fraktion beträgt 12,77 nMol P450/ mg Protein. Auf Grund der annähernd gleich großen spezifischen Konzentrationen der beiden P450-Fraktionen muß angenommen werden, daß es sich bei diesen drei Banden jeweils um P450-Spezies handelt, die sich chromatographisch sehr ähnlich verhalten. Wäre eine dieser Banden ein Fremdprotein, dann müßte die spezifische Konzentration von P450 Ib wesentlich kleiner sein als die von P450 III.
Auch die von Gibson und Schenkman (59) gezeigten SDS-Gelelektrophoresen zeigen für P450 mehrere eng zusammenliegende Banden.
Neben diesen dicht zusammenliegenden P450-Banden weist P450 Ib in der Elektrophorese mehrere geringfügige Verunreinigungen auf, die wohl für die geringere spezifische Konzentration, verglichen mit P450 III, verantwortlich sind.

Die hier vorgestellte Arbeit geht in mehreren Punkten über die bisher erzielten Ergebnisse bei P450-Isolierungen aus nicht vorbehandelten Tieren hinaus. Das isolierte P450 ist höher angereichert als das in den Arbeiten von Gibson und Schenkman (59) und Philpot und Arinc (58).
Es werden vier unterschiedliche P450-Fraktionen gewonnen, Gibson und Schenkman trennen in nur zwei Fraktionen auf, Philpot und Arinc in drei. Darüberhinaus wurden auch die anderen Enzyme des mikrosomalen Monooxygenasesystems mit in die Reinigung einbezogen. Dies ist bisher auch bei induzierten Organismen nicht gelungen.
Die in dieser Arbeit vorgestellte Methodik gestattet es daher, alle Enzyme des Monooxygenasesystems aus einem Organ unter Verzicht auf eine Induktion zu isolieren.
Aus den gereinigten Proteinen soll dann ein rekonstituiertes System aufgebaut werden.

## V. Zusammenfassung

In der hier vorgestellten Arbeit wurde eine Methodik zur Isolierung der Enzyme des mikrosomalen Fremdstoff-monooxygenasesystems aus der Leber eines nicht vorbehandelten Schweines entwickelt.
Die Proteine wurden mit Hilfe von Renex 690, einem nichtionischen Detergens, bei einem Renex/Protein-Verhältnis von 1/1 aus der Membran des Endoplasmatischen Reticulums herausgelöst und nach Konzentrierung durch PEG-Fällungen in einer Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex in vier Fraktionen aufgetrennt, P450 I, P450 II, P450 III mit Cytochrom $b_5$ und der $b_5$-Reduktase sowie P450-Reduktase.

P450 I wurde an Anilin-Sepharose und Hydroxylapatit weitergereinigt und dabei in zwei Fraktionen, P450 Ia und P450 Ib, getrennt. P450 Ib wurde nach einer 40fachen Anreicherung in einer spezifischen Konzentration von 12,77 nMol P450/ mg Protein gewonnen. Die Ausbeute betrug 3,8 %.

Von P450 III wurde zunächst $b_5$ an Anilin-Sepharose und dann die $b_5$-Reduktase an Hydroxylapatit abgetrennt. In nachfolgenden Chromatographien an Anilin- und Laurat-Sepharose wurde P450 III bis zur elektrophoretischen Reinheit präpariert. Das reine P450 III hat eine spezifische Konzentration von 14,09 nMol P450/ mg Protein. Es wurde eine Ausbeute von 3,5 % gewonnen.

Das von P450 III abgetrennte Cytochrom $b_5$ wurde durch Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration weitergereinigt. Nach einer 148fachen Anreicherung erwies sich das isolierte $b_5$ in der SDS-Gelelektrophorese als rein.
Für das reine $b_5$ wurde eine spezifische Konzentration von 38,4 nMol/ mg Protein gemessen. Die Ausbeute lag bei 10,8 %.

Die $b_5$-Reduktase wurde nach der Abtrennung von P450 III durch Chromatographie an Blue Sepharose und Sephacryl S 200

weiterfraktioniert. Es wurden nach einer 217fachen Anreicherung 5 mg reine Reduktase, das entspricht einer Ausbeute von 7,1 %, gewonnen. Die gereinigte $b_5$-Reduktase hat eine spezifische Aktivität von 1174,4 AE/mg Protein.

Die P450-Reduktase wurde in der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex von den übrigen Enzymen des Monooxygenasesystems abgetrennt. Die weitere Reinigung erfolgte an Hydroxylapatit, 2'5'-ADP-Sepharose und an Ultrogel AcA 34. Die Reduktase erwies sich nach einer 791fachen Anreicherung bei einer spezifischen Aktivität von 39,55 AE/ mg Protein, gemessen mit DCPIP als Elektronenakzeptor, in der SDS-Gelelektrophorese als rein. Das Enzym wurde in einer Ausbeute von 25 % gewonnen.

Literaturverzeichnis

(1) Estabrook, R.W. (1979)
in Methods of Enzymology (Fleischer,S. and Packer,L. eds)
Vol LII Part c, 43

(2) Poulsen,L.L., Hyslop,R.M. and Ziegler,D.M. (1974)
Biochem. Pharmacol. 23, 3431

(3) Pederson,T.C., Buerge,T.A. and Aust,S.A. (1973)
J.Biol.Chem. 248, 7134

(4) Strittmatter,P., Spatz,L., Corcoran,D., Rogers,M.J.,
Setlow,B. and Redline,R. (1974)
Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 71, 4565

(5) Klingenberg,M. (1958)
Arch.Biochem.Biophys. 75, 376

(6) Garfinkel,D. (1958)
Arch.Biochem.Biophys. 77, 493

(7) Omura,T. and Sato,R. (1963)
Biochim.Biophys.Acta 71, 224

(8) Omura,T. and Sato,R. (1964)
J.Biol.Chem. 239, 2370

(9) Omura,T. and Sato,R. (1964)
J.Biol.Chem. 239, 2379

(10) Lu,A.Y.H. and Levin,W. (1974)
Biochim.Biophys.Acta 344, 205

(11) Estabrook,R.W., Cooper,D.Y. and Rosenthal,O. (1963)
Biochem.Z. 338, 741

(12) Orrenius,S., Dallner,G. and Ernster,L. (1964)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 14, 329

(13) Cooper,D.Y., Levin,S., Narasimhulu,S., Rosenthal,O.
and Estabrook,R.W. (1965)
Science 147, 400

(14) Remmer,H., Schenkman,J.B., Estabrook,R.W., Sasame,H., Gillette,J.R., Narasimhulu,S., Cooper,D.Y. and Rosenthal,O. (1966)
Molec.Pharmacol. 2, 187

(15) Imai,Y. and Sato,R. (1966)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 22, 620

(16) Schenkman,J.B., Remmer,H. and Estabrook,R.W. (1967)
Molec.Pharmacol. 3, 113

(17) Orrenius,S. and Thor,H. (1969)
Eur.J.Biochem. 9, 415

(18) Estabrook,R.W., Hildebrandt,A., Remmer,H., Schenkman,J.B., Rosenthal,O. and Cooper,D.Y. (1968)
in Biochemie des Sauerstoffs (Hess,B. and Staudinger,H. eds) p. 142, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

(19) Ichikawa,Y. and Yamano,T. (1967)
Biochim.Biophys.Acta 131, 490

(20) Lu,A.Y.H. and Coon.M.J. (1968)
J.Biol.Chem. 243, 1331

(21) Lu,A.H.Y., Junk,K.W. and Coon,M.J. (1969)
J.Biol.Chem. 244, 3714

(22) Imai,Y. and Sato,R. (1974)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 60, 8

(23) van der Hoeven,T.A., Haugen,D.A. and Coon,M.J. (1974)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 60, 569

(24) Ryan,D., Lu,A.Y.H., Kawalek,J., West,S.B. and Levin,W. (1975)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 64, 1134

(25) Guengerich,F.P. (1977)
J.Biol.Chem. 252, 3970

(26) Estabrook,R.W. and Werringloer,J. (1977)
in Advances in Experimental Medicine and Biology
Vol 78 (Reirich,M., Coburn,R., Lahiri,S. and
Chance,B. eds) p. 19, Plenum Press, New York

(27) Orrenius,S. and Ernster,L. (1974)
in Molecular Mechanisms of Oxygen Activation
(Hayaishi,O. ed) p. 215, Acad.Press, New York

(28) Ullrich,V. (1977)
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 27 (II) Nr. 9b, 1821

(29) Robinson,A.E. (1966)
J.Pharm.Pharmacol. 18, 19

(30) Alvares,A.P., Schilling,G., Levin,W. and
Kuntzman,R. (1967)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 29, 521

(31) Ryan,D., Lu,A.Y.H., West,S. and Levin,W. (1975)
J.Biol.Chem. 250, 2157

(32) Lu,A.Y.H., Kuntzman,R., West,S.B., Jacobson,M.
and Conney,A.H. (1972)
J.Biol.Chem. 247, 1727

(33) Lu,A.Y.H., Levin,W., West,S.B., Jacobson,M., Ryan,D.,
Kuntzman,R. an Conney,A.H. (1973)
J.Biol.Chem. 248, 456

(34) Welton,A.F. and Aust,S.D. (1974)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 56, 898

(35) Dean,W.L. and Coon,M.J. (1977)
J.Biol.Chem. 252, 3255

(36) Ullrich,V. and Kremers,P. (1977)
Arch.Toxicol. 39, 41

(37) Horecker,B.L. (1950)
J.Biol.Chem. 183, 593

(38) Williams,C.H.Jr. and Kamin,H. (1962)
J.Biol.Chem. 237, 587

(39) Phillips,A.H. and Langdon,R.G. (1962)
J.Biol.Chem. 237, 2652

(40) Omura,T. (1969)
in Microsomes and Drug Oxidations (Gillette,J.R., Conney,A.H., Cosmides,G.J., Estabrook,R.W., Fouts,J.R. and Mannering,G.J. eds) p. 160, Acad.Press, New York

(41) Glazer,R.J., Schenkman,J.B. and Sartovelli,A.C. (1971)
Molec.Pharmacol. 7, 683

(42) Vermilion,J.L. and Coon,M.J. (1974)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 60, 1315

(43) Dignam,J.D. and Strobel,H.W. (1975)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 63, 845

(44) Yasukochi,Y. and Masters,B.S.S. (1976)
J.Biol.Chem. 251, 5337

(45) Dignam,J.D. and Strobel,H.W. (1977)
Biochemistry 16, 1116

(46) Iyanagi,T. and Mason,H.S. (1973)
Biochemistry 12, 2297

(47) Yasukochi,Y., Peterson,J.A. and Masters,B.S.S. (1979)
J.Biol.Chem. 254, 7079

(48) Iyanagi,T., Makino,N. and Mason,H.S. (1974)
Biochemistry 13, 1701

(49) Jansson,I. and Schenkman,J.B. (1977)
Arch.Biochem.Biophys. 178, 89

(50) Conney,A.H., Brown,R.R., Miller,J.A. and Miller,E.C. (1957)
Cancer Res. 17, 628

(51) Spatz,L. and Strittmatter,P. (1971)
Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 68, 1042

(52) Spatz,L. and Strittmatter,P. (1973)
J.Biol.Chem. 248, 793

(53) Erikson,L.C. and Dallner,G. (1973)
FEBS Letters 29, 351

(54) Estabrook,R.W., Werringloer,J., Masters, B.S.S., Jonen,T., Matsubara,T., Ebel,R., O'Keeffe,D.and Peterson,J.A. (1976)
in The Structural Basis of Membrane Function (Hateli,H. and Djaradi-Ohaniance,L. eds) p.429, Acad.Press, New York

(55) Ingelman-Sundberg,M. and Glaumann,H. (1977)
FEBS-Letters 78, 72

(56) Coon,M.J. (1978)
in Methods of Enzymology (Fleischer,S. and Packer,L. eds) Vol LII Part c, 202

(57) Strittmatter,P., Enoch,H.G. and Fleming,P. (1978)
in Methods of Enzymology (Fleischer,S. and Packer,L. eds) Vol LII Part c, 206

(58) Philpot,R.M. and Arinc,E. (1976)
Molec.Pharmacol. 12, 483

(59) Gibson,G.G. and Schenkman,J.B. (1978)
J.Biol.Chem. 253, 5957

(60) Goa,J. (1953)
J.Clin.Lab.Invest. 5, 218 (1953)

(61) Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.C. and Randall,R.J. (1952)
J.Biol.Chem. 193, 265

(62) Stein-Parve,E.P. and Beinert,H. (1958)
J.Biol.Chem. 233, 843

(63) Levin,Ö. (1962)
in Methods of Enzymology (Colowick,S.P. and Kaplan,N.O. eds.) Vol V, 28

(64) Mazin,A.L., Sulimoon,G.E. and Vanyushin,B.F. (1974)
Anal. Biochem. 61, 62

(65) Cinti,D.L., Moldeus,P. and Schenkman,J.B. (1972)
Biochem. Pharmacol. 21, 3249

(66) Keilin,D. and Hartree,E.F. (1938)
Proc.Roy.Soc.(London) B 124, 397

(67) Vermilion,J.L. and Coon,M.J. (1978)
J.Biol.Chem. 253, 2694

(68) Cuatrecasas,P.J. (1970)
J.Biol.Chem. 244, 4406

(69) Prouty,W.F. and Goldberg,A.L. (1972)
J.Biol.Chem. 247, 3341

(70) Guengerich, F.P. (1978)
J.Biol.Chem. 253, 7931

(71) Cuatrecasas,P., Wilchek, M. and Anfinsen, C.B. (1968)
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 61, 636

(72) Katagiri,M., Takemori,S., Itagaki,E. and Suhara,K. (1978)
in Methods of Enzymology (Fleischer,S. and Packer,L. eds) Vol LII Part c, 124

(73) Gaylor,J.L. and Delwiche,C.V. (1969)
Anal.Biochem. 28, 361

(74) Ryan,D., Lu,A.Y.H. and Levin,W. (1978)
in Methods of Enzymology (Fleischer,S. and Packer,L. eds.) Vol LII Part c, 116

(75) Holloway,P.W. (1973)
Anal.Biochem. 53, 304

(76) Coon,M.J., van der Hoeven,T.A., Dahl,S.B. and Haugen, D.A. (1978)
in Methods of Enzymology (Fleischer,S. and Packer.L. eds.) Vol LII Part c, 109

(77) Strittmatter,Ph., Fleming, P., Connors, M. and Corcoran,D. (1978)
in Methods os Enzymology (Fleischer, S. and Packer, L. eds) Vol LII Part c, 97

(78) Böhme,H.J., Kopperschläger, G., Schulz, J. and Hofmann, E. (1972)
J. Chromatogr. 69, 209

(79) Inman, J.K. and Dintzis, H.M. (1969)
Biochemistry 8, 4074

(80) Iyanagi,T. (1977)
Biochemistry 16, 2725

(81) Weber,K. and Osborn, M. (1969)
J.Biol.Chem. 244, 4406

(82) de Groot, H. (1979)
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf

(83) Ullrich, V. and Weber, K. (1973)
Z.Physiol.Chem. 354, 514

(84) Masters, B.S.S. and Okuta, T.A. (1979)
in Encyclopedea for Pharmacology and Therapie (Schenkman, J. and Kopier, D. eds.)
Pergamon Press, New York

(85) Umezawa, H. and Aoyagi, T. (1977)
in Proteinases in Mammalian Cells and Tissues (Barret, A.J. ed.) North Holland Publishing Co., New York

(86) Van der Hoeven, Th.A. and Coon, M.J. (1974)
J.Biol.Chem. 249, 6302

(87) Johnson, E.F. and Müller-Eberhard, U. (1975)
J.Biol.Chem. 252, 2839

(88) Klein, A. (1980)
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf

(89) Ryan, D., Lu, A.Y.H., West, S. and Levin, W. (1975)
J.Biol.Chem. 250, 2157

(90) Hashimoto, Ch. and Imai, Y. (1976)
Biochem.Biophys.Res.Commun. 68, 821

(91) Kamataki, T., Sugiura, M., Yamazoe, Y. and Kato,R. (1979)
Biochem.Pharmacol. 28, 1993

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Lehrstuhl I, der Universität Düsseldorf in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. W. Haas durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. S. Hollmann für die Überlassung des Arbeitsplatzes, die Betreuung der Arbeit und seine stete wissenschaftliche und menschliche Förderung.

Herrn Professor Dr. L. Birkofer danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. W. Haas danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und besonders dafür, daß er seine Technische Assistentin, Frau G. Matilou, bei diesem Projekt miteingesetzt hat. Erst dadurch konnten die umfangreichen Isolierungen bewältigt werden.
Darüberhinaus möchte ich mich bei ihm und auch bei Herrn Professor Dr. H. Kröner für vielfältige Hilfen, Anregungen und Diskussionen bedanken.

Frau G. Matilou und Frau M. Wallner waren zeitweilig an den Laborarbeiten beteiligt, auch bei ihnen bedanke ich mich herzlich.

Lebenslauf

Am 2. Juni 1949 wurde ich als Sohn der Eheleute Theodor Leidemann und Vera, geb. Krüger, in Leverkusen geboren.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in Koblenz-Lützel. Ostern 1960 wechselte ich zum Eichendorff-Gymnasium in Koblenz und legte dort 1969 die Reifeprüfung ab.

Von 1969 bis 1971 leistete ich eine zweijährige Dienstzeit bei der Bundeswehr ab.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich das Studium der Biologie an der Universität zu Köln. Im Dezember 1975 bestand ich die mündlichen Diplomprüfungen. Die Diplomarbeit, durchgeführt am Institut für Biochemie der Universität zu Köln unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. L. Jaenicke, beendete ich im März 1977.

Im Oktober 1977 begann ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. S. Hollmann am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Düsseldorf mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation.

Im Juni 1977 heiratete ich meine Frau Ulrike, geb. Hemkes.

Druck: Hundt Druck GmbH, Zülpicher Str. 220, 5000 Köln 41, Tel. (0221) 44 41 52